Vol. IV Novembre 1932 - A. XI Fasc. XI

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

BOLLETTINO

DELLA

SEZIONE ITALIANA

SOMMAIRE

S. BELFANTI et C. ARNAUDI – **Sur une lécithase du pancreas produisant la lysocithine.**

Dès 1924, l'un de nous (Belfanti) avait déjà extrait du pancréas un phosphatide qui montrait un fort pouvoir hyperglycémique et qu'on avait désigné par le nom de « *Substance Y* » (1). Peu de temps après (2, 3), Belfanti démontra qu'à cette substance était liée une fraction insoluble dans l'éther, soluble dans l'alcool et dans l'eau, et douée d'un fort pouvoir hémolytique et leucolytique. En comparant les caractéristiques de cette substance, qui fut alors dénommée « *hémoleucolysine* », avec la lysocithine de Délezenne-Fourneau, il put démontrer que les propriétés chimiques, aussi bien que les activités biologiques des deux hémolysines, étaient presque identiques.

Ensuite on est parvenu a une identification plus exacte de la lysocithine avec l'hémoleucolysine du pancréas, au cours de recherches entreprises pendant les années suivantes. Mais, c'est seulement aujourd'hui qu'un de nous (Belfanti) est arrivé à isoler du pancréas le ferment qui hydrolise la lécithine en lysocithine.

Cette note a pour but de communiquer, au moins succinctement, les caractéristiques de cette enzyme (*).

Le ferment dont il est question, est capable d'hydroliser non seulement la lécithine du pancréas, mais aussi celle de l'oeuf, du foie, du coeur et des reins, en donnant lieu à la formation de lysocithine.

La préparation de ce ferment est très délicate. Avant tout, il faut utiliser du pancréas absolument frais; le mieux est de pratiquer l'extraction immédiatement après l'abatage de l'animal. Il semble que le pancréas de cheval soit plus riche en ferment que celui des bovidés; c'est incontestablement le mieux adapté à cette préparat ion. Aussitôt extirpé de l'ani-

---

(1) *S. Belfanti*, « Intorno ad una sostanza iperglicemizzante negli estratti di pancreas ». Rendiconti R. Ist. Lomb. di Sc. Lettere, vol. 57, 1°, 1924.

(2) *S. Belfanti*, « Intorno alla emoleucolisina del pancreas e dei suoi rapporti con la lisocitina di Delezenne e Fourneau ». Boll. Ist. Sierot. Milanese, 1924.

(3) *S. Belfanti*, « Ueber das Hämoleukolysin des Pancreas und dessen Bezug zum Delezenne Fournauschen Lysocitin ». Bioch. Zeit., 154 Band., Heft 1-2, 1924.

(*) Cette note étant déjà sous presse, nous avons reçu un ouvrage du Dr. *Ziro Nikuni* (du Laboratoire de Chimie agr. de l'Université de Tokyo, dirigé par le Prof. *U. Suzuki*), apparu dans le « Bull. of the agric. Chem. Soc. of Japan », vol. VIII, 104, 1932. L'A. y communique ses dernières recherches, par lesquelles il démontre l'existence, dans le pancréas séché et pulverisé et de même dans la pancréatine du commerce, d'un ferment ayant le pouvoir d'hydrolyser la lécithine en lysocithine. Bien que *Nikuni* n'ait pas séparé le ferment comme nous l'avons fait, il est pourtant interessant de relever que ses résultats sont en complexion parfaitement d'accord avec les nôtres. La rapide et graduelle disparition de la lysocithine obtenue au moyen de pancréas pulverisé, qui a été constaté par *Nikuni*, est aussi bien parfaitement explicable si l'on pense que l'A. a fait usage de pancréas in toto et non pas du ferment, ainsi que nous l'avons fait. Il a introduit de cette manière dans le procès de fermentation tout le système enzymatique du pancréas, qui possède une forte action sur les lécithines et — comme a été demontré dans notre Institut — transforme la lécithine et la lysocithine en choline, acides gras et acide glycéro-phosphorique.

mal, le pancréas est nettoyé; puis il est finement broyé; on le met ensuite en suspension dans un peu d'eau (environ un poids égal) et on le laisse pendant 12-15 heures à la température de 0° à 5°-6° C. On filtre, et on centrifuge le filtrat; le liquide limpide est concentré dans le vide à 35°-38° C, jusqu'à ¼ de son volume; puis, il est précipité par un volume d'alcool, ou un volume et ¼ au *maximum*. En effet, la plus grande partie et la plus pure est recueillie au moyen d'un volume d'alcool à 95° C. L'acétone n'en précipite que de petites quantités des solutions aqueuses. On centrifuge alors le précipité alcoolique; on le dissout à nouveau dans un peu d'eau et après avoir séparé par centrifugation la partie qui demeure non dissoute, on précipite à nouveau par l'alcool, dans les mêmes conditions. On centrifuge et finalement on dessèche dans le vide à la température ordinaire.

L'ensemble des manipulations doit être prévu de façon à ce que ces dernières phases se suivent sans interruption.

Le produit que l'on obtient se présente en petites écailles luisantes et jaunâtres qui, après leur pulvérisation, donnent une poudre blanche, assez facilement soluble dans l'eau et qui est faiblement soluble en alcool dilué. En solution aqueuse, le produit même donne une réaction négative à la méth. de Fehling et à celle de Millon. Il donne un léger troublement avec l'acide phospho-wolphramique, l'acétate de plomb, et le nitrate d'argent. Avec l'hydrate de barium et le bichlorure de mercure il donne aussi une opalescence très légère.

Après hydrolise avec HCl, la solution demeure limpide et on ne remarque aucune trace de choline. Le ferment obtenu de la sorte, présente une faible activité amylolytique, protéolytique et lypasique.

L'action hydrolisante du ferment vis-à-vis des lécithines se produit très rapidement. On a essayé les lécithines du pancréas, des reins, du coeur, du foie, extraites de ces divers organes de boeuf; on a essayé aussi l'ovolécithine naturelle, l'ovolécithine extraite et l'ovolécithine cadmique; l'ovolécithine naturelle est plus facilment hydrolisée de l'ovolécithine extraite, et l'ovolécithine cadmique ne l'est tout à fait. Naturellement, on a contrôlé avec soin les lécithines provenant des organes, afin d'établir au préalable si elles ne renfermaient pas des traces de lysocithine (1).

Dans toutes les épreuves faites en vue d'étudier les propriétés du ferment, on a employé la lécithine de l'oeuf, en mettant en suspension le jaune d'oeuf frais directement dans une solution physiologique stérile. Les oeufs étaient préalablement lavés et désinfectés à l'extérieur par l'alcool; on en cassait la coque et on en retirait le jaune avec toutes les précautions voulues d'asepsie. Les premiers essais ont été faits avec des

(1) M.lle *Francioli* a mis en évidence, dans des travaux qui sont encore en cours d'exécution, la présence de lysocithine dans les organes desséchés de différents animaux.

suspensions d'un jaune d'oeuf dans 50 cmc. de solution physiologique; mais au cours des recherches l'on a constaté qu'il est plus convenable d'utiliser des suspensions plus délayées et exactement un jaune d'oeuf (environ 20 grammes) pour 200 cmc. de solution physiologique ou d'eau distillée. Il faut donc noter que, dans les descriptions qui suivent, chaque fois que l'on n'indiquera pas la quantité, en parlant de suspension d'ovolécithine, il s'agira toujours d'un jaune d'oeuf pour 200 cmc. Les lécithines d'organe qu'on avait préparées par extraction alcoolique et par des purifications successives à l'acetone, ont été employées à 1% en solution physiologique. On a utilisée aussi la lécithine cadmique dans la même proportion.

Parmi les diverses lécithines utilisées pour ces expériences, celle qui est hydrolisée le plus facilement par le ferment c'est la lécithine du pancréas. On repartit dans des tubes stériles 10 cmc. des suspensions de lécithine. Pour la lécithine de l'oeuf, on utilise la suspension: un jaune d'oeuf pour 50 cmc. de solution physiologique. Chaque tube est additionné de 5 ctgr. de ferment. Après 12, 30 et 48 heures de séjour à l'étuve, à 45° C, on fait les épreuves de l'hémolyse, en ajoutant cmc. 0,1 des suspensions respectives de lécithine à 2 cmc. de suspension de globules de mouton à 5% en solution physiologique.

Toutes les épreuves étaient accompagnées de séries de contrôle: les unes, avec des suspensions des lécithines sans adjonction de ferment, les autres, avec du ferment ajouté directement à la suspension des hématies, afin de contrôler un pouvoir hémolytique direct éventuel; en effet, lorsque la purification n'a pas été exécutée tout à fait soigneusement au préalable, ce pouvoir peut se manifester, vraisemblablement par suite de la présence de quelques traces de lysocithine du pancréas, ou de lécithine reduite en lysocithine, adérentes au ferment.

TABLEAU N. 1

Lecture des hémolyses après 45′ de séjour à l'étuve, à 37° C et après 15-18 h. de glacière.

	Résultat après		
	12 heures	30 heures	48 heures
Lécithine de pancréas + ferment	+ + + +	+ + + +	+ + + +
» d'oeuf + »	+ + — —	+ + + —	+ + + +
» des reins + »	+ + — —	+ + — —	+ + + +
» du coeur + »	+ — — —	+ + — —	+ + + +
» du foie + »	+ + — —	+ + + —	+ + + +
Contrôles:			
Lécithine de pancréas	— — — —	— — — —	— — — —
» d'oeuf	— — — —	— — — —	— — — —
» des reins	— — — —	— — — —	— — — —
» du coeur	— — — —	— — — —	— — — —
» du foie	— — — —	— — — —	— — — —
Hématies seules	— — — —	— — — —	— — — —
Ferment + hématies	— — — —	— — — —	— — — —

+ + + + Hémolyse totale. — — — — Absence absolue d'hémolyse.

***

Toute une série de recherches a été faite aussitôt dans le but d'identifier les propriétés de la substance hémolytique dérivant de l'action du ferment sur les lécithines et de les comparer avec celles de la *lysocithine.*

Huit jaunes d'oeuf ont été soigneusement mis en suspension dans 400 cmc. de solution physiologique stérile, et toutes les manipulations successives ont été faites avec les précautions nécessaires pour conserver ce matériel stérile. On a ajouté gr. 0,032 de ferment, en portant ensuite le ballon à 45° C. Au bout de 24 heures, la suspension lécithinique était devenue hémolytique. Le tout a été gardé à l'étuve pendant trois jours encore, après quoi on a procédé à l'extraction, à la purification et au dessèchement de la substance hémolytique formée de cette façon. On obtient alors 2 grammes d'une substance blanche, qui présente un pouvoir hémolytique très fort; elle peut en effet lyser les globules rouges de mouton se trouvant en suspension à 5%, dans la solution physiologique, à la proportion de 1 : 20.000. Cette substance est soluble dans l'eau et dans l'alcool; elle est insoluble dans l'éther. En solution alcoolique, elle précipite avec $Cd\,Cl_2$, donnant un précipité qui, après lavage et dessication, manifeste, à son tour, un pouvoir hémolytique considérable. La substance même contient du phosphore organique; par hydrolyse avec l'HCl, elle dégage de la choline et des acides gras. Tous ces caractères sont bien les caractères propres à la lysocithine qu'on obtient par l'action des venins des ophidés et des abeilles sur les lécithines (1, 2, 3). Nous croyons donc d'être autorisés à conclure que la substance hémolytique élaborée par la *lécithase du pancréas*, au cours de l'hydrolyse de la lécithine, est la *lysocithine.*

***

L'*optimum* de la température pour l'action de notre lécithase oscille autour de 37° C; mais son activité est encore considérable même à 45° C. Au cours de nos expériences, nous avons, en effet, souvent utilisé cette température de scission, car elle est moins favorable aux développements microbiens et, par conséquent, permet plus facilement de garantir les tubes au cours des essais contre des contaminations dangereuses.

---

(1) *Delezenne* et *Ledebt*, C. R. Acad. des Sc., vol. CLII (1910, CLIII (1911), CLV (1910).

(2) *S. Belfanti*, « I veleni degli animali nella biologia ». Soc. Ital. di Biochimica, Bologna 1926.

(3) *A. Contardi* e *P. Latzer*, « Die Tierischen Gifte in der Chemie ». Bioch. Zeit., B. 197, 1928.

L'*optimum* du pH est entre 6,8 et 7. Au dessous de 5,7 son action est très ralentie et presque nulle. Au dessus de 7,6 la scission a lieu très lentement, bien que n'étant pas brusquement arrêtée comme on l'observe pour la réaction acide.

On prépare stérilement des tubes contenant de l'ovolécithine en suspension aqueuse. La concentration ions-hydrogène de cette suspension est au pH 7. En ajoutant des quantités progressives d'acide citrique ou de Na OH, on prépare quatre séries de tubes avec la suspension aqueuse de lécithine à pH 5,5; 5,7; 6,3; 6,5; 6,7; 7; 7,3; 7,6. Deux de ces séries sont additionnées de ferment; puis on les porte à l'étuve à 37° et à 45° C. Les autres deux séries, sans adjonction de ferment, sont portées aussi à l'étuve, aux mêmes températures et représentent les témoins.Chaque tube contenant 10 cmc. de suspension de lécithine est additionné avec gr. 0,05 de ferment. Tous les tubes gardés à 37° C, avec ou sans ferment, sont additionnés de cmc. 0,1 de toluol, afin d'empêcher le développement de germes, éventuellement adhérents au ferment.

Après 17 heures de séjour à l'étuve, on pratique les épreuves d'hémolyse en ajoutant cmc. 0,5 de suspension de lécithine, à 10 cmc. de suspension d'hématies. Au bout de 45′ de séjour à l'étuve à 37° C, et après 15-18 heures de glacière, on lit les résultats indiqués dans le Tableau N. 2.

TABLEAU N. 2

pH des suspensions de lécithine	Température de la scission			
	37° C.		45° C.	
	Contrôles	Lécithase	Contrôles	Lécithase
5.5	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
5.7	— — — —	+ + — —	— — — —	± — — —
6.3	— — — —	+ + + —	— — — —	+ + + —
6.5	— — — —	+ + + +	— — — —	+ + + +
6.7	— — — —	+ + + +	— — — —	+ + + +
7.0	— — — —	+ + + +	— — — —	+ + + —
7.3	— — — —	+ + + +	— — — —	+ + — —
7.6	— — — —	+ + ± —	— — — —	± — — —
Contrôle hématies	— — — —		— — — —	
Lécithase seule sur hématies.	— — — —		— — — —	

On a aussi titré le pouvoir hémolytique des lécithines partiellement hydrolysées appartenant aux deux séries portées à 37° C et à 45° C, aux différents pH, dans le but de déterminer, avec une plus grande exactitude, la température de scission la plus favorable et le degré *optimum* de concentration en ions-hydrogènes. Les résultats obtenus après un séjour de 45′ à l'étuve à 37° C et après 15 heures de glacière, ont été recueillis dans le Tableau N. 3.

TABLEAU N. 3.

	Temp. de scission	Titre de la dilution 1 : 1	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 40	1 : 50
pH 5.5	37°	+ — — —	± — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 5.7	37°	+ + + +	+ + + ±	+ + + —	+ — — —	± — — —	— — — —
	45°	+ + + +	+ + + —	+ — — —	± — — —	— — — —	— — — —
pH 6.3	37°	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ + — —	+ — — —	— — — —
	45°	+ + + +	+ + + +	+ + ± —	+ ± — —	+ — — —	— — — —
pH 6.5	37°	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ + — —
	45°	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ + — —	+ — — —	± — — —
pH 7	37°	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + —
	45°	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + —
pH 7.3	37°	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ + — —	+ — — —
	45°	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ — — —	— — — —	— — — —
pH 7.6	37°	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ + — —	+ — — —	± — — —
	45°	+ + + +	+ + + +	+ + + —	+ — — —	+ — — —	± — — —

	Temp. de scission	Titre de la dilution 1 : 60	1 : 70	1 : 80	1 : 90	1 : 100	1 : 110
pH 5.5	37°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 5.7	37°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 6.3	37°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 6.5	37°	+ — — —	+ — — —	± — — —	± — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 7	37°	+ + — —	+ — — —	+ — — —	+ — — —	+ — — —	— — — —
	45°	+ + — —	+ — — —	+ — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 7.3	37°	± — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
pH 7.6	37°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —
	45°	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —

Les suspensions de lécithine qui avaient été préparées en eau distillée avant les épreuves d'hémolyse, étaient additionnées d'1/10 de leur volume de solution stérile de NaCl a 9,4%, pour les rendre isotoniques vis-à-vis de la suspension physiologique d'hématies. En effet, ainsi qu'on l'a mentionné ci-dessus, nous avons trouvé plus convenable de mettre en suspension la lécithine dans de l'eau distillée plutôt qu'en solution physiologique, car le ferment y agit le mieux. Nous avons même voulu

faire une expérience spéciale afin de mettre plus nettement en évidence le phénomène. Deux séries de tubes contenant, l'une, l'ovolécithine en suspension aqueuse, et l'autre l'ovolécithine en solution physiologique ont été additionnées de quantités décroissantes de ferment et portées ensuite à l'étuve a 45° C, pendant 16 heures. Aux tubes de la série préparée avec la solution aqueuse on a ajouté 1/10 du volume de solution stérile de NaCl à 9,4% et, après avoir soigneusement mélangé, on a cherché à établir le pouvoir hémolytique des différentes suspensions par comparaison avec celui des suspensions correspondantes, préparées avec la solution physiologique. A 10 cmc. de suspension d'hématies de mouton on a ajouté 1 cmc. des suspensions en examen. Au bout de 45′ à 37° C et de 15 heures de glacière, les résultats étaient les suivants:

TABLEAU N. 4

Gr. de lécithase pour 10 cmc. de suspension d'ovolécithine	Série en eau distillée. Adjonction de NaCl au moment de l'épreuve	Série en solution physiologique
0,025	+ + + +	+ + — —
0,010	+ + + —	+ — — —
0,005	+ — — —	— — — —
0,0025	— — — —	— — — —
0,001	— — — —	— — — —

Nous avons étudié aussi la manière de se comporter de notre ferment vis-à-vis de l'action de la chaleur, en déterminant cette action sur des solutions aqueuses à pH 5,7; 7; 7,6, à des températures croissantes de 2 en 2 degrés, entre 44° C et 100° C. Pour chaque degré different de température les tubes y étaient maintenus pendant 5 minutes. Les résultats obtenus montrent que dans nos conditions expérimentales la réaction du milieu n'a pas exercé une influence remarquable sur l'action de la température par rapport au ferment. La lécithase semble inactivée, dans les trois solutions, vers 58 à 60° C. Même en prolongeant l'action du ferment sur la lécithine pendant 48 heures et en l'utilisant dans la proportion de 5 ctgr. pour 10 cmc. de suspension de lécithine, on n'obtient pas la plus petite trace d'hémolyse, si le ferment a été soumis antérieurement à l'action de la chaleur, entre 58 et 60° C, pendant 5 minutes.

De même, si la lécithine sous l'action du ferment séjourne plus longuement soit à la température ordinaire, soit à 37° et 45° C, on n'a aucun indice que la lysocithine formée se décompose ultérieurement.

Nous avons gardé pendant plus de deux mois, soit à température ordinaire, soit à 45° C, de petits ballons contenant de la suspension de lécithine en cours d'hydrolyse fermentative, et de temps en temps nous avons prélevé quelques centimètres cub. de matériel dont nous avons déterminé le titre hémolytique. Celui-ci est demeuré constant pendant toute la période d'observation. De même la recherche de la choline, qui aurait été un autre indice de la décomposition de la lysocithine, a toujours été négative.

Des suspensions de lécithine sur lesquelles on a fait agir la lécithase à pH 5,7; 7; 7,6 et qui ont été gardées à l'étuve à 45° C pendant un mois se sont montrées également stables.

Cette partie du problème est encore à l'étude, ainsi que d'autres points portant sur les propriétés de la lécithase. Nous sommes en train de nous occuper de ces dernières, dans un travail en collaboration avec M.lle Francioli, que nous remercions ici vivement pour la collaboration qu'elle nous a apporté au cours des recherches relatées dans cette note même.

Institut Sérothérapique de Milan.

PUNTONI V. **Peut-on admettre une reconstitution bacillaire dans ce que Petragnani appelle " phénol-bactéries "?**

Dans ce *Bulletin* ont paru récemment deux nouvelles communications de Petragnani (1) sur les solutions phénolo-bactériennes. Si, d'une part, elles exigent des éclaircissements en ce qui concerne les propriétés optiques des solutions phénolo-bactériennes, d'autre part, elles arrivent à point pour préciser la nature du phénomène présumé de la reconstitution bacillaire dans ces solutions.

Des divers travaux de Petragnani ressortent maintenant deux conclusions fondamentales:

1) En mélangeant des cultures de B. tuberculeux avec du phénol cristallisé, on obtiendrait un liquide, que l'auteur a nommé solution phénolo-bactérienne, et dans laquelle les bacilles disparaîtraient par une dispersion des colloïdes qui constituent leur corps (2).

2) Si l'on dissout dans l'eau ou dans certains dissolvants (p. ex. dans l'éther) les solutions phénolo-bactériennes centrifugées ou passées à travers des bougies, on observe la reconstitution des corps bacillaires;

---

(1) Bull. Sect. Ital. Soc. Inter. Microbiol., sept. 1932, pag. 226-239.

(2) Dans la première communication faite sur les phénolo-bactéries, *Petragnani* a considéré la disparition des B. tuberculeux comme un phénomène physique de diaphanisation et d'isotonisation (ce Bulletin, avril 1931, pag. 647 et suiv.).

cette reconstitution releverait d'un phénomène d'agrégation des colloïdes en état de dispersion. Dans la dernière des notes mentionnées, l'auteur affirme en outre, que ce phénomène serait favorisé par une légère réaction alcaline (pH = 7,3) et empêché par une réaction acide (1).

Examinons les phases de ces modifications très speciales.

***

1) MANIÈRE DE SE COMPORTER DES B. TUBERCULEUX DANS LE PHÉNOL PUR. — Contrairement à Petragnani, qui a affirmé l'indifférence optique envers l'énergie centrifuge des b. tuberculeux émulsionnés dans le phénol pur, j'ai démontré dans une note précedente que rien de tout cela n'avait lieu (2).

Les solutions phénolo-bactériennes brutes (c'est-à-dire ni filtrées, ni centrifugées) se montrent troubles du fait de la présence, dans le phénol liquide, d'une très grande quantité de suspensions qui sont désignées par Petragnani simplement comme « quelques flocons », mais qui, au contraire, sont constituées par de très nombreux amas bacillaires, bien visibles à l'agglutinoscope et que l'on peut mettre evidence en faisant des préparations colorées par le Ziehl-Neelsen, ou en observant le liquide à l'ultramicroscope.

Par centrifugation ou par sédimentation spontanée on peut obtenir un abondant dépôt bacillaire (contrôle microscopique), proportionné a la quantité de bacilles employés.

La conservation des bacilles dans les suspensions phénolo-bactériennes est parfaite; ils restent tout à fait inaltérés et bien colorables même dans des suspensions préparées quatre mois auparavant.

N'ayant pas la possibilité de nier le tableau optique que l'on observe à l'ultramicroscope, Petragnani, dans ses deux dernières notes, affirme que ce tableau se montre dans les suspensions phénolo-bactériennes brutes, mais que toutefois on l'observe aussi dans le phénol pur liquide — et en conséquence même dans les suspensions phénolées après centrifugation ou filtration —; en outre, que cet aspect est formé par des amas banaux de granulations cocco-bacillaires; et enfin que « si Puntoni, en suivant les bonnes règles de la recherche expérimentale, avait fait le contrôle voulu sur le phénol pur, il aurait ainsi évité une méprise... etc. » (sic). (V. pag. 237, 238 et 239).

Je déclare avant tout que le contrôle a été dûment effectué par moi, bien que non relaté pour éviter d'inutiles digressions et je puis assurer

(1) *Dessy* affirme au contraire (ce Bulletin, avril 1932, pag. 99) que ce phénomène est favorisé par une réaction légèrement acide.

(2) Ce Bulletin, juin 1932.

le Prof. Petragnani que ma pratique dans les observations ultramicro scopiques est suffisante pour ne pas prendre des vessies pour des lanternes.

Mais, d'ailleurs, on ne peut comprendre comment Petragnani ait pû avancer une si étrange affirmation. A-t-il porté, peut-être, son attention sur des liquides phénolés sales ou en cours de cristallisation par manque d'eau ?

Le phénol liquide — abstraction faite de contaminations accidentelles que l'on peut d'ailleurs observer dans toute sorte de liquide — est, en effet, optiquement vide, tandis que les suspensions phénolo-bactériennes intégrales, non sédimentées ressemblent à une réaction d'agglutination.

La différence est telle qu'elle ne peut laisser de doutes, et je regrette que les règles de rédaction de ce Bulletin, ne comportent pas la documentation photographique des observation, car alors toute discussion cesserait avec l'évidence des faits.

***

2) La presumée reconstitution bacillaire. — Bornons la discussion aux faits affirmés par Petragnani.

On pourrait, il est vrai, soulever des objections sur la régularité et sur la façon dont se comporte le phénomène, mais je crois inutile de relater encore une fois des détails expérimentaux, car Petragnani chercherait à expliquer la discordance des faits en disant — ainsi qu'il l'a déjà fait deux fois dans ses dernières notes (pag. 228 et 230) — que cette discordance relève de la mauvaise préparation des suspensions phénolo-bactériennes (1).

Puisque Petragnani, dans ses expériences de reconstitution bacillaire, parle toujours de « bacilles » et de « corps bacillaires » nous croyons qu'il donne à ces expressions leur signification biologique propre, savoir celle de microbes organisés (même en admettant que ces microrganismes ne soient pas vivants). Car s'il voulait donner à ces expressions la simple signification étymologique de formations en batônnet non organisées, tout l'intérêt de ces communications disparaîtrait et il n'y aurait plus aucune raison de discuter.

Les bacilles, comme toute cellule animale ou végétale, ne sont point constitués par des amas de micelles colloïdales qui puissent se désagréger et se reconstituer par suite de simples phénomènes de dispersion et d'agrégation. Ils se présentent comme des organismes qui se constituent suivant les lois inconnues de la germination vitale, avec une structure tout à

(1) Cette préparation difficile des suspensions phénolo-bactériennes consiste simplement dans le broyage au mortier de cultures bacillaires et de phénol cristallisé, et dans l'adjonction de petites quantités d'eau jusqu'à obtenir l'état liquide du phénol.

fait spécifique, un protoplasma enveloppé d'une membrane bien déterminée, qui obéit à des lois biologiques spéciales et empèche que les colloïdes qui forment le corps du bacille se dispersent dans le milieu ou puissent pénétrer à nouveau à travers cette membrane par suite de simples actions chimiques. Une fois désagrégés, les corps des êtres jadis organisés, ne peuvent plus se reconstituer par de simples actions physico-chimiques.

Dans le cas spécial du B. tuberculeux il s'agit, en outre, d'un microbe qui possède (dans sa phase classique) une fixité somatique tellement exceptionnelle, qu'elle ne change ni par l'action des acides, ni par celle des alcalis énergiques ou des hypochlorites alcalins, ni, par le phénol pur, ainsi que nous l'avons dit plus haut.

Les formes bactéroïdes observées par Petragnani sont, au contraire des *fantômes fugitifs* qui, par suite d'une légère variation du pH, se dispersent et se reconstituent facilement. Leur acido-résistance est bien faible ou même douteuse. Leur adhésion aux lames est aussi tellement faible (après fixation), contrairement à ce qu'on observe chez les vrais bacilles, que, d'après Petragnani, il faut les y coller par addition de sérum; en outre, l'action prolongée de l'alcool les dissout..... !

Tous ces caractères prouvent avec la plus grande évidence que les formations décrites par Petragnani, n'ont rien de commun avec les B. tuberculeux. Il s'agit peut-être d'états micellaires bactéroïdes de substances extraites des cultures par le phénol; probablement il s'agit d'acides gras ainsi que je l'ai signalé dans ma première note. Enfin, ces formations bactéroïdes n'ont rien de spécifique, car on peut aussi les obtenir avec des extraits phénoliques de cires.

Si l'on observe parfois quelques rares bacilles tuberculeux vrais dans les solutions aqueuses de phénolo-bactéries simplement centrifugées, cela rélève non d'une reconstitution, mais du fait que ces bacilles ont échappé à la centrifugation, et ces rares unités bacillaires subissent un enrichissement lors de la formation du précipité qui a lieu quand on dissout le phénol. Ce fait, au contraire, n'a jamais lieu quand on emploie des suspensions phénolo-bactériennes soigneusement filtrées à travers bougie et de l'eau distillée, privée des microbes (parfois acido-résistants) qui peuvent éventuellement s'y trouver.

Je crois que le Prof. Petragnani va se rallier bien vite à ces conceptions. Dans sa première communication, il admettait que les B. tuberculeux émulsionnés dans le phénol pur étaient capables de passer à travers les bougies, d'une façon intégrale, par suite d'un phénomène d'isotonisation (1); ensuite il croit à la dispersion en bloc et à la reconstitution du

(1) Ce Bulletin, oct. 1931, pag. 647.

protoplasma (1); enfin il formule la conception que les formations bactéroïdes relèvent du mouvement des divers antigènes (partigènes) qui subissent l'influence de la réaction du milieu (2).

Nous avons l'espoir que dans une note ultérieure M. Petragnani reconnaîtra qu'il s'agit de simples formations chimiques, d'agrégations micellaires en bâtonnets, qui n'ont rien de commun avec une structure vitale ni avec des corps bacillaires.

CONCLUSIONS.

Le phénol pur liquide constitue un milieu très favorable pour la conservation des corps des B. tuberculeux. Dans ce milieu, ces bacilles ne subissent aucune altération, même après plusieurs mois.

Les B. tuberculeux en suspension dans le phénol forment des amas, que l'on peut — quoique éclaircis — aisément observer au microscope et à l'ultramicroscope. Macroscopiquement, ils sont bien visibles, spécialement si on prend comme terme de comparaison le phénol pur; on peut aussi les centrifuger et les sédimenter.

Le phénomène d'une reconstitution bacillaire dans les solutions phénol-bacilles ne peut pas au point de vue biologique avoir lieu; il n'existe pas au point de vue expérimental; il relève seulement d'une interpretation erronée de formations chimiques qui prennent parfois l'aspect de bâtonnets.

Institut de Bactériologie de l'Université de Rome.

BATTAGLIA M. – **Origine du pigment noir dans les cultures de l'" eumices tuberculosis ".**

Comme on le sait, dans les cultures en milieu liquide favorable il se développe un enduit d'abord blanc et mince, qui, au fur et à mesure qu'il se développe à température convenable, devient épais. D'un blanc éclatant il tourne à un blanc laiteux, puis à un blanc caséeux, puis en vieillissant, à un blanc châtain, et à un blanc grisâtre, et enfin en précipitant au fond, il commence à brunir et avec le temps il devient noir-sépia. Ce phénomène se produit aussi sur les milieux solides favorables où l'on peut l'observer de même. Avec l'apparition de cette couleur noir-sépia, qui gagne toute la colonie développée, coïncide la lyse de l'Eumycète tuberculeux, lyse, qui dans les milieux solides, apparaît,

---

(1) Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., Sez. di Siena, Séance 22 février 1932.
(2) Ce Bulletin, sept. 1932, pag. 238.

beaucoup plus tardivement et non d'une manière uniforme. Si l'on pratique la culture du bacille de la tuberculose de Koch, du type humain, et bovin, dans un milieu liquide approprié et dans un gros récipient, de manière que sur le milieu de culture, il reste un grand volume d'air, au moment du développement, on remarque, à une température de 30° à 37° C., un gros enduit de couleur et de consistance caséeuse, qui demeure ainsi pendant plusieurs jours. Après avoir prélevé cet enduit, par des méthodes bien adaptées, on peut le fixer en se servant des méthodes de la technique histologique, le couper au microtome, ou le fixer dans de petites ampoules aux fins de démonstrations didactiques. On voit aussi que cet enduit est composé d'un entrelacement mycellaire de tubes pleins, coralliformes, ot vides avec des oospores; les tubes et les filaments coralliformes et les oospores sont riches en éléments bacilliformes ou cocciformes, alcoolo-acido-resistants. Si l'on inocule une partie de cet enduit à un cobaye, celui-ci reproduit l'évolution ordinaire de la tuberculose chez cet animal.

Si l'on met cet enduit, d'un blanc-caséeux, dans une capsule en contact avec de l'acide sulfurique anhydre, on voit que celui-ci se dissout complètement en dégageant une forte odeur de fromage, ainsi qu'il arrive avec la substance caséeuse des lésions tuberculeuses de l'homme et des bovidés. Cet enduit se dissout même s'il est traité par de l'ammoniaque; en faisant, dans un deuxième temps, évaporer l'ammoniaque au bain-marie, il reste de nombreux dépôts cristallins en forme d'aiguilles, granuleux et amorphes.

Il est difficile, dans une pareille culture, de saisir le moment où l'enduit cultural est d'un blanc uniformément caséeux, puisque, de petites taches rouge-châtain, et brun chatâin, jusqu'à celles d'un brun noirâtre apparaissent en divers points.

Ainsi à l'examen chimique microscopique en dehors de cristaux de tyrosine, on en trouve d'autres différents, par leur forme et par leurs réactions microchimiques. De sorte que dans cet enduit la tyrosine est abondante: mais on y trouve aussi des lipides et des cires. On peut remarquer pourtant, que, à mesure que l'enduit du blanc caséeux ou blanc jaunâtre passe au brun-noirâtre, la tyrosine disparaît. Smoll, déjà en 1903, en examinant la substance caséeuse des lésions tuberculeuses de l'homme avait trouvé, de 13 à 23% de cholestérine, de lécithine, et de graisses simples, et le reste, de 87% à 79%, d'albumoses, de peptone, de léucine et de tyrosine. Si l'on pratique la culture du bacille tuberculeux de Koch, du type humain et bovin, sur une pomme de terre glycérinée, on remarque le noircissement de la culture en un temps très bref, en comparaison de ce qui se passe dans le milieu liquide. Sur pomme de terre, l'état de couenne caséiforme, riche en tyrosine, dure peu de temps.

On sait depuis longtemps que la tyrosine noircit sous l'action d'un ferment qui agit par oxydation (Bertrand, Bull. Soc. Chim., Paris, 1908) et que V. Furth et Yérasalem, en 1907 (Zur Kenntnis der mélanoschen Pigmente und der fermentative Melaninbildung, Hofmeister Beiträge Chim. Physiolog., Bd. 10, 1907), ont obtenu la mélanine de la tyrosine des champignons. La tyrosine, comme on le savait déjà par les recherches biologiques appuyées récemment par celles de Robertzon Jen M. en 1931-1932, existe en certaine quantité dans le tubercule de la pomme de terre et dans celui du dahlia (Chemistry departement, Edimburg and East of Schotland College of Agricolture, Royal Society of Edimburg Proceeding Session, 1931-32, Part II, vol. LII).

En voyant donc comment l'enduit de la culture du bac. tub. de Koch, du type humain et bovin, épais, de couleur blanche, se change en blanc jaunâtre caséeux, se modifie d'aspect et d'épaisseur, est riche en tyrosine, perd cette substance en noircissant, noircit beaucoup plus vite sur pomme de terre, on peut déduire que le pigment noir de la culture du bacille de la tuberculose dérive de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase. Nous avons ainsi une autre preuve biologique, par l'examen des diverses parties constituant la couenne culturale du bacille de la tuberculose, que celui-ci est un eumycète et que son pigment noir appartient aux groupe des mélanines. La substance caséeuse, qu'on trouve dans les lésions anatomo-pathologiques de la tuberculose naturelle et expérimentale répond aussi à tous les caractères culturaux et microchimiques de l'enduit cultural de l'eumyces tuberculosis, comme nous l'avons dit.

RÉSUMÉ.

L'enduit des cultures du bacille de Koch spécialement dans un milieu liquide favorable acquiert un aspect blanc jaunâtre épais semblable à la substance caséeuse qu'on trouve dans les lésions anatomo-pathologiques tuberculeuses humaines, bovines, et expérimentales. Cet enduit tourne peu à peu à une couleur noir-sépia, parce que la tyrosine, par action de la tyrosinase, se change en mélanine.

ABONDANO HERRERA ALBERTO. – **Contribution à l'étude de la chimiothérapie des trypanosomiases.** Note préliminaire.

Les différentes formes de babesiellose dont sont frappés les bovidés de la République de Colombie, peuvent être traitées avec succès en inoculant par voie intraveineuse de la Trypaflavine Bayer. Le trypanbleu, le tartre d'émétique, les arsénobenzols, l'urotropine etc., au contraire, sont inactifs.

L'affinité que la substance colorante jaune de la trypaflavine démontre pour les parasites, m'a poussé à étudier l'action de l'acide picrique sur ces protozoaires: les résultats de ces recherches seront décrits par la suite. Plus tard je me suis proposé d'établir l'action de l'acide picrique, seul ou bien associé à d'autres médicaments du groupe des arsénobenzols, sur les trypanosomes, et j'ai choisi l'infection produite par le *Trypanosoma Brucei* sur la souris blanche.

Ne connaissant pas le pouvoir toxique, par voie intraveineuse, de l'acide picrique sur la souris blanche, j'ai pratiqué des inoculations progressives pour établir la dose *minima* mortelle de cette substance, et j'ai constaté qu'elle était de 0,20 gr. par kilog.

Au cours de ces recherches préliminaires, j'ai observé que l'acide picrique donne lieu à une coloration jaune des muqueuses et de la cornée des animaux frappés de lésions hépatiques; ce phénomène ne se manifeste point chez les animaux sains, même si la dose d'acide picrique est beaucoup plus forte.

La dose *minima*, toxique pour les animaux atteints de trypanosomiase, correspond à peu près à la moitié de celle des animaux sains: il s'agit donc de 0,10 gr. par Kilog.

Les mélanges d'acide picrique et d'arsénobenzol Pieroni ne démontrent aucune variation de leur toxicité respective: le pouvoir toxique d'un des produits s'additionne à celui de l'autre. Il est, en effet, possible de tuer les animaux avec la moitié des deux doses mortelles *minima*, administrées en même temps.

Le pouvoir thérapeutique de l'acide picrique, inoculé par voie intraveineuse ou souscutanée, à différents lots d'animaux, en une seule dose de 7, 6, 5, 4, 2,5, ctgr. par Kilog de poids, fut nul, car le cours de l'infection n'en fut jamais influencé et les animaux moururent en même temps que leurs témoins.

De même l'arsénobenzol Pieroni administré, par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, aux doses de 5, 4, 2,5, ctgr. par Kilog de poids, n'a eu aucune influence sur le cours de la trypanosomiase, ou, alors, d'une façon impossible à apprécier.

Mais l'association de l'acide picrique et de l'arsénobenzol Pieroni, à la dose de 5, 3, 2,5 ctgr. de chaque composant par Kilog de poids de l'animal inoculé, a démontré une action thérapeutique moyenne, plus prononcée par voie sous-cutanée que par voi intraveineuse, mais pas très intense: le nombre des trypanosomes présents dans la circulation fut seulement réduit, mais non annulé.

Ensuite je fis des expériences avec le Néoiacol administré à doses variables de 5 à 1,5 ctgr. par Kilog de poids. Les résultats furent satisfaisants et les trypanosomes disparurent de la circulation elle même, pendant une période de 19 jours. Le Néoiacol est plus actif s'il est inoculé par voie sous-cutanée que par voie intraveineuse.

Les mélanges d'acide picrique et de Néoiacol, à des doses respectives variant de 1,25 à 0,5 ctgr. par Kilog. de poids, furent aussi actifs mais pas plus que le Néoiacol seul. Ces mélanges démontrèrent une activité supérieure lorsqu'ils furent inoculés par voie sous-cutanée plutôt qu'intraveineuse.

Mes expériences appuient les résultats obtenus par Zironi en se servant d'un grand nombre d'arsénobenzols, c'est-à-dire que ces médicaments ont une activité supérieure contre la trypanosomiase des souris, s'ils sont inoculés par voie sous-cutanée.

De nouvelles recherches me permettront d'étudier le mécanisme de ce phénomène qui est des plus intéressants: l'histologie, par la détermination microchimique des arsénobenzols présents dans les organes, pourra élucider ce problème.

Mes résultats prouvent, comme Zironi l'a déjà fait connaître, qu'un arsénobenzol très stable bicopulé (arsenobenzol Pieroni) est beaucoup moins actif contre la trypanosomiase de la souris, qu'un arsénobenzol monocopulé dont la molécule est plus instable. Il faudra aussi rechercher avec soin la cause de ce fait.

Il est intéressant de remarquer qu'il n'existe aucun rapport entre le pouvoir thérapeutique des arsénobenzols dans le traitement de la trypanosomiase des souris et de la syphilis de l'homme: on sait que l'arsénobenzol Pieroni — comme d'autres produits bicopulés — possède une activité remarquable dans le traitement de la syphilis.

Il sera aussi nécessaire d'établir un parallèle entre l'action que les deux types de composés ont, chez les souris, pour le traitement de la syphilis, si toutefois les difficultés techniques inévitables qui vont surgir, n'arrètent pas les recherches.

Institut Sérothérapique de Milan, Laboratoires scientifiques de la Direction.

TROSSARELLI LUIGI – **Etude bactériologique d'un phlegmon gazeux du côté antéro-latéral de la cuisse droite, d'origine appendiculaire.**

Plusieurs AA. se sont occupés des recherches bactériologiques des appendicites, en étudiant la flore de l'appendice normal de l'homme, ou bien des appendices prélevés sur des cadavres ou enlevés chirurgicalement.

Il existe aussi un grand nombre de recherches expérimentales faites dans le but d'éclairer le problème de l'appendicite.

Les études sur les appendices saisis et sur les appendices malades ont porté à conclure: 1) que la flore microbienne de l'appendice est la même que celle du gros intestin; 2) que plus l'appendice est pathologique, plus diminue le nombre des espèces microbiennes qui y sont présentes; 3) la flore qui se trouve dans les appendices des cadavres est la même qu'on observe du vivant du sujet.

Parmi les nombreuses bactéries que différents AA. ont isolées dans les appendicites, je rappellerai: le *Bacterium coli*, le streptocoque, le staphylocoque, les paratyphiques, les bacilles *fragilis*, *ramosus*, *perfrigens*, *oedematiens*, etc.

Laurelle, Clado, Banti Klemme et d'autres AA. ont attribué une grande importance au *Bacterium coli*; Frankel, Achard, Broca au streptocoque, tandis que Lanz, Veillon Zauber, Tavel, Perrone, etc. l'ont attribuée aux anaérobies.

Aschoff, et ensuite Lubarsch, dans les appendicites aigües au début, n'ont observé la présence que de deux espèces de microrganismes (un diplocoque et un petit bacille) tous les deux Gram-positifs, mais qui n'ont point été identifiés avec précision.

Kretz a étudié avec soin 14 cas d'appendicite phlegmonneuse avec péritonite et amygdalite et dans 12 de ces cas il remarque la présence du streptocoque dans le péritoine et dans les amygdales: tout dernièrement Hilgermann et Pohl ont remarqué que 93 cas d'appendicite sur 156 présentaient la même flore microbienne (pneumocoque, streptocoque, et pour quelques uns des associations fuso-spirillaires) dans l'appendice et dans les amygdales.

Récemment Sette et Bancaroli ont observé, à l'examen bactériologique pratiqué sur 94 appendices enlevés chirurgicalement à cause de manifestations inflammatoires, que dans 22 cas, le contenu de l'appendice était stérile, et dans 30 cas ces AA. n'ont isolé que le *Bacterium coli* ordinaire. Dans les autres cas, ils ont isolé une flore mixte formée de streptocoques, de staphylocoques, de *B. pratens*, *B. putrificus*, *B. faecalis alcaligenes*. Dans 2 cas ils isolèrent aussi le *Bacillus perfrigens*.

Ayant eu l'occasion d'observer à « l'Hôpital Mauriziano » un cas de phlegmon gazeux du côté antéro-latéral de la racine de la cuisse droite, d'origine appendiculaire, et ayant pû l'étudier bactériologiquement d'une façon complète, il m'a semblé utile de le décrire à cause de sa formation atypique et pour apporter ma modeste contribution au problème étiologique, encore mal expliqué, des appendicites.

Le patient en question tomba malade d'une appendicite ordinaire. Après une période d'amélioration, pendant laquelle la fièvre était peu à peu tombée, la température était remontée (39,5) et le pouls devenu fréquent (120), tandis que l'état général avait rapidement empiré, mais sans douleurs abdominales.

Ce ne fut qu'une semaine après cette recrudescence qu'en faisant assevir le malade, un matin, sur son lit, pour l'examen quotidien de l'appareil respiratoire, il accusa une forte douleur au bassin à la flexion de la cuisse droite. Pendant la nuit il avait déjà senti une tension douloureuse au même point.

Un examen très soigné de la cuisse droite ne me fit remarquer rien d'anormal en dehors d'un point très douloureux auprès de la racine de la cuisse droite sur la partie antéro-latérale, s'accompagnant d'un léger oedème.

Le matin suivant je remarquais que le diamètre de la cuisse, à sa racine, avait subi une forte augmentation, que la peau était tendue et luisante et que la douleur à la flexion de la cuisse sur la branche et à la pression sur la partie antéro-latérale était devenue beaucoup plus forte: la palpation me révela une crépitation emphysémateuse bien caractérisée.

Je fis une ponction exploratrice, avec une aiguille de calibre moyen fixée à une seringue en verre de 20 cc., au point le plus douloureux et où la crépitation était plus distincte. En traversant la peau et les premières couches musculaires j'avais senti une certaine résistance, mais arrivé à 5 cc. de profondeur j'eus l'impression d'entrer dans une cavité; le piston de la seringue fut violemment repoussé en arrière et je le retins avec peine tant la pression était forte. En déplaçant légèrement l'aiguille à l'intérieur de cette cavité, je tâchais d'en extraire quelque gouttes de liquide qui se présenta sanieux et d'une odeur infecte.

Je préparai des plaques pour l'étude de la flore aérobie et anaérobie de ce liquide, et je pus ainsi isoler les germes suivants:

1) un bacille à forme d'un bâtonnêt, Gram-négatif. Il se développe en bouillon en le troublant; sur gélose il forme une couche ayant des reflets bluâtres. Avec les hydrates de carbone suivants il produit de l'acide et des gaz: glucose, lactose, lévulose, mannite, maltose, saccha-

rose; il coagule le lait et le rend acide, résiste à la crée, ne liquéfie pas la gélatine. Ces caractères prouvent qu'il s'agit du *Bacterium coli communis.*

2) un bacille à forme de bâtonnêt, Gram-negatif. Il trouble le bouillon d'une façon diffuse. Sur gélose, il donne lieu à une culture à reflets bleuâtres: il produit de l'acide et des gaz dans les hydrates de carbone suivants: glucose, lactose, maltose, lévulose, mannite. Il n'attaque pas le saccharose, mais coagule et acidifie le lait; il résiste à la bile, et ne liquéfie pas la gélatine. Toutes ces caractères prouvent qu'il s'agit du *Bacterium coli communis.*

3) un bacille à forme de bâtonnet ayant les extrémités coupées nettement, Gram-positif, strictement anaérobie. Cultivé en bouillon, il le trouble en dégageant de l'hydrogène sulfuré, et développe de l'acide et des gaz dans les hydrates de carbone suivants: glucose, lactose, lévulose, maltose, saccharose: il n'attaque pas la mannite, coagule le lait, et liquéfie la gélatine. Ces caractères prouvent qu'il s'agit du *Bacillus perfrigens.*

4) Un grand nombre de *cocci* non définis.

Le jour suivant la ponction exploratrice, comme la tuméfaction de la cuisse avait encore beaucoup augmenté, le chirurgien y pratiqua une grande incision d'où sortirent à peu près 300 cc. d'un liquide sanieux ayant une odeur infecte.

Douze jours après l'intervention chirurgicale, au point d'où il n'etait, jusqu'alors, sorti que du pus commencèrent à sortir des matières fécales. Il s'était donc formée une fistule stercoraire spontanée.

L'était d'intoxication du patient, malgré tous les traitements, devint toujours pire: neuf jours après l'intervention chirurgicale il succomba.

Autopsie: Ayant ouvert la cavité de l'abdomen je remarque que l'épiploon est complètement déplacé à droite et a fait adhérence avec le caecum.

Ayant délivré le caecum de ses adhérences avec l'épiploon, je remarque que le caecum même est adhérent à la parois postérieure de l'abdomen; en le soulevant je découvre une grande cavité rétro-péritonéale remplie de pus et de matières fécales.

Cette cavité se prolonge vers le bas, traverse la « lacuna muscolorum » vers la partie antéro-latérale de la cuisse droite, où se trouve l'incision pratiquée par le chirurgien. Ayant enlevé le caecum j'observe un appendice de dimensions moyennes, perforé et gangréné qui y adhére.

Mon examen bactériologique, comme ceux des différents AA., ne permet pas d'affirmer avec sûreté qu'un microrganisme particulier soit

l'agent étiologique des appendicites. Il fait admettre que le processus appendiculaire peut être dû à différents microrganismes, qui, dans les conditions normales, se trouvent dans notre intestin et s'y comportent comme de simples saprophytes.

Institut de Bactériologie et d'Immunologie de l'Université Royale de Turin. - « Ospedale Mauriziano Umberto I » de Turin.

BIBLIOGRAPHIE.

Achard et *Broca*, Bull. de la Soc. Méd. des Hôp. de Paris, 1897.
Bagger et *Mikkelsen*, Revue Sud-Américaine d'Endocrinologie, n. 1, 1926.
Bonamone, Rome, 1911.
Boese, Wiener. Klin. Wochenschrift, n. 15, 1908.
Brunn, Beitrage zur klin. Chir., 1904.
Clado, Comp. rend. de la Soc. de Biol., 1892.
Gardi, La Medicina Italiana, n. 16, 1906.
Casurio, Napoli, 1900.
Finzi, Compt. rend. Soc. de Biol. de Paris, 1909.
Fraschella, Policl., Sez. Chir., novembre 1910.
Heyd, Med. Klinik, n. 44, 1908 — Beitr. klin. Chir., 1909.
Lanz et *Tavel*, Revue de Chirurgie, 1904.
Riff, Presse Médicale, 1919.
Mocquot, Bulletin Médical, mars 1932.
Salinari, La Clinica chirurgica, 1908.
Sette e *Bancaroli*, Policlinico, Sezione Chirurgica, mars 1932.
Winternitz, Ord. Hetil., 1900.

DE' ROSSI G. – **Les microbes du sol et la fixation de l'azote atmosphérique.**

(Rapport au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan, Octobre 1932).

SOMMAIRE: I. Objet et limites du Rapport. – II. Mise en évidence du pouvoir azoto-fixateur des microbes et causes relatives d'erreurs. – III. Diffusion du pouvoir azoto-fixateur chez les microbes. – IV. Les Azotobacters. – V. Les Clostridiums fixateurs d'azote. – VI. Les microbes des tubercules des légumineuses. – VII. Activité azoto-fixatrice des microbes dans le sol. – VIII. Applications pratiques. – IX. Conclusions. – X. Bibliographie.

I. — Objet et limites du Rapport.

Dans ce Rapport, je n'ai pas voulu donner un tableau complet de tout ce qui a été écrit jusqu'à présent sur la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol par les microbes. Cela aurait constitué une répétition inutile des publications déjà existantes, parmi lesquelles je me borne a rappeler ici l'importante monographie d'Omeliansky (1) sur les microbes azoto-fixateurs du sol, qui parut en 1923, et celle de Mueller et Stapp (2)

de 1925, sur les bactéries des tubercules des légumineuses. Toutes deux comportent une bibliographie très riche.

Vers la même époque (1922) j'ai tâché de recueillir le plus exactement et le plus complètement possible, dans mon Traité de Microbiologie [3], tout ce qu'on savait à propos des microbes azoto-fixateurs, symbiotiques et non symbiotiques.

Mais cette étude a encore attiré l'attention des savants et l'activité des chercheurs; de nombreuses observations nouvelles viennent s'accumuler de plus en plus, et différentes questions, toujours controversées, ont été amplement discutées. Il paraît donc vraiment opportun, en partant de nos connaissances précédentes, de tâcher d'établir si dans ces dernières dix années la question a avancé, et dans quelle direction et jusqu'à quel point. Il est aussi utile de s'arreter aux conceptions les plus remarquables qui ont été énoncées à ce propos, et aux conclusions pratiques qu'on peut en tirer en ce qui concerne le problème très intéressant de l'entretien de la fertilité du sol.

II. — Mise en évidence du pouvoir azoto-fixateur des microbes et causes relatives d'erreurs.

Dans la question de la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol, il y a un point particulièrement intéressant et encore très discuté: la diffusion du pouvoir azoto-fixateur parmi les microbes. Aujourd'hui encore, comme précédemment, cette propriété est considérée par les uns comme étant particulière à un petit nombre d'especès schyzomycétiques; pour d'autres, elle serait commune à beaucoup de microbes, tandis que, pour d'autres encore, elle est une fonction normale propre à toutes ou à presque toutes les cellules végétales. Nous ne discuterons pas ici l'aptitude des plantes supérieures à assimiler l'azote élémentaire, aptitude qui a été affirmée et démentie tant de fois. Nous devons exposer seulement les théories les plus récentes, se rapportant au pouvoir azoto-fixateur des organismes microscopiques.

Une question se presente immédiatement en quelque sorte préjuicielle, et qu'on doit resoudre avant tout. Etant donné la discordance des différentes opinions sur le sujet (discordance qui persiste depuis longtemps et malgré une grande quantité d'observations et de recherches expérimentales dont les résultats les plus divers et même tout à fait opposés ont été souvent obtenus en partant d'une même espèce microbienne ou d'un même groupe de microrganismes), nous nous croyons autorisé à demander: Quelle est la valeur des moyens d'investigation généralement adoptés pour étudier la fixation microbienne de l'azote élémentaire? Est-ce que dans la technique expérimentale relative il existe des causes

d'erreur pouvant infirmer plus ou moins sérieusement la valeur des résultats auxquels on aboutit?

L'importance fondamentale de cette question est bien évidente; elle ne se rapporte pas seulement à ces nombreux microrganismes dont l'activité est controversée, mais elle a une valeur générale, pour ce qui concerne tout le problème de l'assimilation microbiologique de l'azote. En effet, même pour les microbes auxquels on attribue universellement une fonction azoto-fixatrice (les Azotobacters, les Clostridiums, les bactéries des tubercules des légumineuses) les opinions sont encore très divergentes, soit à propos de la véritable portée de la fonction même, soit du mécanisme par lequel elle se développe, soit des conditions qui l'influencent, etc. Très problablement, la principale si non l'unique cause de ces discordances doit être recherchée dans le différent degré d'exactitude et de certitude des méthodes expérimentales et d'analyse utilisées par les différents chercheurs.

En réalité, la mise en evidence et l'évaluation du pouvoir azoto-fixateur des microbes se base sur une méthôde unique. Elle consiste toujours à doser l'azote contenu dans des milieux de culture naturels appropriés (par ex., le terrain), ou artificiels (milieux de culture liquides ou solides) avant et après y avoir fait développer les microrganismes soumis à l'examen. Mais les détails d'exécution de la recherche, dans toutes ses phases (choix et préparation du milieu nutritif, préparation et traitement successif de la culture, détermination de l'azote) sont très variés et il est facile de démontrer que bien souvent ils présentent des imperfections considérables qui rendent le résultat final inexact, ou même faux. Il est vrai qu'aucune recherche scientifique n'est exempte de causes d'erreur plus ou moins manifestes et, par conséquent, plus ou moins inévitables; mais il est vrai aussi que, dans le cas qui nous intéresse maintenant, ces causes d'erreur, tout en étant nombreuses et évidentes, sont passées pourtant inaperçues d'un très grand nombre de chercheurs.

Tout le mond sait que dans l'air il existe des traces d'ammoniaque, d'acide nitreux et nitrique, et que ces produits se trouvent, surtout et dans des proportions à ne pas négliger, dans l'air de nos laboratoires [4]. Pourtant de nombreux chercheurs ont rangé sans plus dans le groupe des azoto-fixateurs, des microrganismes dont les cultures librement exposées à l'air du laboratoire pendant 15-20 jours, et même plus, montraient un contenu en azote légèrement augmenté; ils n'ont pas pensé que cette augmentation pouvait être attribuée, non pas à une assimilation de l'azote élémentaire de l'air, mais à l'utilisation, de la parte des microbes, des composés ammoniacaux, nitreux et nitriques, parfois même à une simple fixation des composés mêmes, par les milieux de culture nutritifs. Les

quantités d'azote gagnées de la sorte ne sont certainement pas très grandes et lorsqu'il s'agit de microbes doués d'un pouvoir azoto-fixateur réel et énergique, elles sont pratiquement négligeables. Mais, le fait de constater l'augmentation de quelque dixième de milligramme d'azote dans les cultures d'autres microrganismes, ne permet de tirer aucune conclusion certaine, si l'on n'a pas eu la précaution de liberer de l'azote combiné l'air qui est en contact avec les cultures mêmes. Nous pourrions citer ici plusieurs recherches évidemment faussées par cette cause d'erreur; mais il suffira de rappeler les observations assez récentes de BRAUN et GOLDSCHMIDT (5), d'après lesquelles le *Bac. tuberculosis*, le *Bac. typhi*, le *Bac. paratyphi*, le *Bac. de Shiga* et le *Bac. coli* pourraient utiliser l'azote de l'air, à condition qu'il s'agisse de l'air de l'étuve.

MARIE LÖHNIS (6) a mis récemment en évidence une autre particularité de technique, qui aurait trompé beaucoup de ceux qui ont admis la fixation de l'azote dans les cultures pures du *Bac. radicicola*, mais dont on doit se souvenir aussi dans l'étude des azoto-fixateurs non symbiotiques. Aussi bien les extraits de terrain que les décoctions végétales, où tous ces microrganismes ont été très-souvent cultivés, dans le but d'en déterminer le pouvoir azoto-fixateur, pourraient contenir, selon les observations de LÖHNIS, confirmées aussi par WILSON, HOPKINS et FRED (7), des quantités non négligeables de composés azotés volatiles que les microrganismes assimilent durant le développement cultural et que les contrôles perdent par contre durant le séjour à l'étuve. Aucune démonstration d'azoto-fixation ne saurait, en conséquence, être reconnue comme démonstrative, si le milieu nutritif n'a pas été analysé au moment de la préparation des cultures. Par contre, lorsque les analyses sont faites après la période d'incubation (et ceci s'est produit, d'après LÖHNIS, dans la plupart des recherches rapportées jusqu'à présent), les résultats sont souvent dépourvus de toute valeur, puisque l'excés d'azote présenté par les cultures vis-à-vis des contrôles peut dépendre, non pas d'un gain, mais d'une perte évitée à la suite de la transformation de l'azote volatile — qui cependant s'est perdu dans les contrôles — en azote fixe du plasma microbien.

Une troisième cause d'erreur, peut être moins apparente que les précédentes, mais d'une valeur probablement préponderante, a été signalée par moi (8) depuis 1922, à l'appui de mon opinion à propos du peu de sécurité des recherches démontrant la grande diffusion du pouvoir azoto-fixateur parmi les microrganismes. Je remarquais alors, que les petits gains constatés au cours des expériences exécutées avec des milieu de culture contenant déjà de l'azote combiné, peuvent dépendre tout simplement du fait que des composés impossibles à doser parfaitement par la méthode de Kjeldahl, ont été transformés par activité microbienne

en d'autres, dont l'azote est totalement mis en évidence par la même méthode.

Bien qu'il puisse sembler étrange qu'une considération aussi simple aie pû échapper à tous les chercheurs, il n'en est pourtant moins vrai que dans la littérature antérieure, on n'en trouve pas mention. Par contre, plusieurs expériences ont successivement confirmé l'importance de cette considération. Ainsi BRISTOL et PAGE [9], dans leur belles recherches, démontrant l'inaptitude des algues à fixer l'azote atmosphérique, ont éclairé l'erreur de ceux qui avaient cru observer un gain en azote par action des algues cultivées dans les milieux de culture contenant de l'azote nitrique. Celui ci n'est pas dosable par la méthode de Kjeldahl, mais il est, par contre, dosé dans les combinaisons organiques après son assimilation par les algues. De même, HOPKINS [10], en discutant les résultats positifs obtenus par beaucoup d'auteurs pour la fixation d'azote dans les cultures de *Bac. radicicola*, affirme le peu d'importance qu'ont les recherches exécutées avec des milieux à base d'extraits de terre, qui contiennent toujours des nitrates, à moins que l'on n'ait employé des méthodes analytiques sûrement capables de mettre en évidence aussi l'azote nitrique. Pour confirmer son assertion, Hopkins rapporte quelques expériences exécutées par lui même. Plusieurs cultures de *Bac. radicicola* en milieu à l'extrait de terre avec 1% de glucose ou de saccharose et 0,05-0,1% de phosphate bipotassique, ont présenté un gain moyen de mg. 2,5 en azote, dans les analyses exécutées par la méthode de Gunning, modifiée de sorte à comprendre aussi dans le dosage (ainsi qu'on le croit d'habitude) les nitrates. Lorsque l'experience fut faite, par contre, par la méthode de DAVISSON et PARKER [11] qui est beaucoup plus apte à déceler l'azote dans les nitrates, aucune différence ne fut relevée entre le contenu en azote des cultures de *Bac. radicicola* et celui des contróles stériles.

Mais je pense que ces constatations de BRISTOL et PAGE et d'HOPKINS, tout en étant justes, sont encore incomplètes. Les nitrates en effet ne sont pas seuls à fausser les recherches exécutées avec des extrait de terre et d'autres milieux; il y a encore d'autres composés organiques (par ex. certains ammino-acides et alcaloides, certains dérivés de l'acide urique, la créatine et la créatinine, etc.) qui présentent de notables difficultés à l'analyse par la méthode de Kjeldahl, même avec ses modifications pour la rendre plus sensible [12]. Quelques uns, au moins, de ces composés doivent se trouver couramment dans l'extrait de terre, tel qu'on l'a employé dans beaucoup de recherches exécutées jusqu'à présent sur la fixation de l'azote, c'est-à-dire préparé, suivant les indications de LÖHNIS [13] et de FISCHER [14], en melant de la terre avec un poids d'eau égal, ou avec une solution de carbonate sodique à 1 ‰ et en chauffant,

pendant une demi heure ou plus, en autoclave, à une atmosphère de pression. D'autres milieux organiques n'échappent certainement pas à la possibilité d'erreurs analytiques analogues. En effet, il faut admettre la présence de composés azotés refractaires au traitement par le Kjeldahl mais assimilables par les microrganismes et transformables en composés dont l'azote est facilement déterminable, pour pouvoir interpréter les résultats de quelques unes de mes expériences récentes ([15]). Des quantités exactement mesurées de gélatine de viande, d'urine et d'autres matières organiques furent ensemencées avec une goutte d'une suspension de terre, et gardées pendant quelques jours, à l'étuve à 20-30° dans une atmosphère d'hydrogène, qu'on renouvelait fréquemment. Les plus rigoureuses précautions furent prises pour garantir l'absence absolue d'air, et, partant, d'azote élémentaire. Or, l'essai de l'azote par les méthodes de Kjeldahl et de Jodlbauer aurait mis presque toujours en évidence, dans ces matières où il y avait eu un développement microbien abondant, un contenu en azote légèrement mais surement supérieur à celui des témoins analysés au commencement de l'expérience.

Après toutes ces constatations, les résultats des recherches récentes de Greaves et Carter ([16]) acquièrent une signification tout à fait spèciale. En répétant une affirmation précédente, mais certainement non mieux fondée, d'Emerson ([17]), on tendrait, dans ces recherches, à attribuer le pouvoir de fixation de l'azote à la presque totalité des microrganismes. Greaves et Carter en effet, en essayant de nombreux microbes isolés d'un terrein aride de l'Utah dépourvu d'Azotobacters (10 actynomices, 8 bactéries, 8 microcoques, 1 pénicille) ont vu que tous ces germes — sauf un seul — donnaient lieu à un gain en azote (de 0,25 à 8,1 mg.) lorsqu'ils étaient cultivés pendant 21 jours à 28° dans de la terre mélangée avec 2,5% de mannite et avec 20% d'eau et stérilisée en autoclave pendant 4 heures, c'est-à-dire dans un milieu riche en nitrates et en d'autres composés azotés, échappant probablement à la détermination. Par contre ils se montraient tous inactifs dans le liquide d'Ashby, où les véritables azoto-fixateurs, comme l'observe Winogradsky ([18]), ne se refusent jamais de manifester quelque gain en azote.

Tout considéré, nous nous croyons autorisé à accepter avec beaucoup de reserves, toute prétendue démonstration du pouvoir azotofixateur de microrganismes, qui soit basée sur la constatation d'un maigre gain en azote dans les cultures à base d'extrait de terre ou en d'autres milieux contenant des proportions notables d'azote combiné.

Veut-on encore une preuve à l'appui de cette affirmation? Il suffit de voir ce qui arrive dans les terreins nutritifs, dépourvus d'azote ou très pauvres, propres au développement des vrais microbes azoto-fixateurs: par ex., dans les plaques de silice ou de gélose simple, imprégnées

d'une solution de mannite et de sels minéraux. WINOGRADSKY [19], sur les plaques de silico-gel ensemencées avec des grains de terre, et ultérieurment DE ROSSI [20], sur plaques de gélose ensemencées avec des suspensions de terre, ont parfois remarqué, à côté d'un développement très vigoreux des Azotobacters (et également, dans des conditions déterminées, des Clostridiums azoto-fixateurs) l'apparition de quelques colonies de microbes qu'on appelle oligonitrophiles (plus proprement appellés oligazophiles par WINOGRADSKY). Ces derniers peuvent atteindre un certain développement aux dépenses de l'azote combiné, dont les plaques de silice ne contiennent que de simples traces et les plaques de gélose une proportion un peu supérieure, mais toujours très limitée. Mais, en déhors de ces oligazophiles, complètement incapables d'utiliser l'azote élémentaire, aucun des nombreux microbes communs, très repandus dans le terrain, et dont les cultures ont été considérées si souvent capables de fixer l'azote (groupes du *Bac. subtilis*, du *Bac. coli*, du *Bac. vulgaris*, du *Bac. prodigiosus*, du *Bac. fluorescens*, actinomycètes, hyphomicètes, torules, etc.) ne donne jamais de colonies sur ces plaques. Aucun n'est donc apte à se développer sur ces milieux, en utilisant l'azote de l'air. On ne peut pas supposer d'ailleurs que cela dépende d'autres conditions défavorables, car il suffit d'ajouter un peu de terre aux milieux pour obtenir un très abondant développement de toutes ces espéces de microrganismes du sol [20].

Nous sommes ainsi arrivés à la conclusion qu'une démonstration sûre du pouvoir azoto-fixateur des microrganismes ne peut se baser que sur des recherches exécutées avec des milieux nutritifs dépourvus d'azote, ou n'en contenant que des traces.

III. — DIFFUSION DU POUVOIR AZOTO-FIXATEUR CHEZ LES MICROBES.

Après tout ce que l'on a exposé, on ne saurait considérer sans beaucoup de scepticisme les résultats des nombreuses recherches qui dans les dix dernieres années seraient venues confirmer les affirmations précédentes d'une très large diffusion du pouvoir azoto-fixateur parmi les microrganismes. Les causes d'erreur, en effet, mises récemment en évidence rendent très peu dignes de confiance la plupart de ces recherches, anciennes et nouvelles. Elles sont contredites, du reste, par d'autres recherches exécutées suivant une technique expérimentale correcte.

On sait, en effet, que, contrairement aux conclusions de BEIJERINCK et VAN DELDEN [21], un certain pouvoir azoto-fixateur avait été attribué au *Bact. aerogenes* par LÖHNIS [22] et par FISCHER [23]. Et ainsi se renouvelle la divergence entre les observations récentes de SKINNER [24] et celles de SELIM [25]. Le second a constaté la fixation d'azote dans les

cultures de *Bact. aerogenes* en milieux à l'extrait de terre; le premier, au contraire, essayant 23 souches du même microorganisme sur gélose Ashby et sur d'autres milieux de culture dépourvus d'azote ou très pauvres en azote (et, par suite, vraiment aptes à mettre en évidence un éventuel pouvoir azoto-fixateur), a obtenu des résultats qui dans leur ensemble peuvent être considérés comme absolument negatifs.

On sait également que les affirmations de LÖHNIS [illegible] à propos de l'aptitude de certaines espèces du groupe *Bac. subtilis*, de *Bact. lactis viscosum*, de *Bac. prodigiosus*, de *Bac. radiobacter* et d'autres schizomycètes, à assimiler l'azote atmosphérique, se basaient sur de petites augmentations constatées à la suite du développement des microorganismes pendant trois semaines en décoction de terre. C'est sur une base analogue que s'appuyent les recentés recherches de GREAVES et CARTER [illegible], dont on a déjà mis en évidence le peu de valeur; celles de BONDORFF [illegible] qui, partant de cultures impures d'*Azotob. chroococcum* et de *Bac. radicicola*, a isolé un *Planobacillus nitrofigens*, capable d'enrichir en azote l'extrait de terre avec 2 % de mannite; celles de RICCARDO [illegible] relatives au pouvoir azoto-fixateur de *Actinom. chromogenes* et de *Mycob.* [illegible] cultivés en extrait de terre mannité; celles de BEIJERINCK [illegible] qui bien qu'avec beaucoup de réserves, attribuait la capacité de fixer l'azote élémentaire, dans la solution de malate potassique à 1 % et phosphate potassique à 0.2-0.5 ‰ avec addition de terre et acide humique, à un *Spirillum lipoferum* (que SCHROEDER [illegible] a reconnu comme complètement inactif après des essais très soignés en d'autres milieux nutritifs); celles de VELICH [illegible] concernant le pouvoir azoto-fixateur d'un *Actinom.* [illegible] thermophile cultivé dans une infusion glucosée de terre; celles enfin de SELIM [illegible] qui a essayé sur un extrait de terre glucosé, avec trois semaines d'incubation à 21°, plusieurs schyzomycètes communs, et pour certains d'entre-eux (*Bact. aerogenes*, *Bac. megaterium*, *Bac. saccharobutyricus*) aurait obtenu des augmentations en azote supérieures à celles des Azotobacters (!), pour d'autres (*Bac. cloacae*, *Bac. radiobacter*, *Bac.* [illegible]*genes*, *Bac. prodigiosus*, *Bac. malabarensis*, etc.) pas de gain chez beaucoup de souches et chez quelques autres souches de très petits gains qui pouvaient être augmentés par adjonction de terre, pour d'autres enfin des résultats toujours negatifs mais qui devenaient cependant positifs par adjonction de terre stérile au milieu.

Si pour toutes ces expériences et pour d'autres analogues, il est permis de relever dans l'emploi de la terre ou des extraits de terre une cause possible d'erreur qui nous rend très incertains sur leur valeur réelle, nous ne pouvons également attribuer beaucoup d'importance aux recherches de TRUFFAUT et BEZSSONOFF [illegible], qui par des artifices compliqués de laboratoire (comprenant aussi l'emploi de composés azotés) ont

mis en évidence une remarquable activité azoto-fixatrice d'un *Bac. Truffauti*, que WINOGRADSKI [33] considère comme une souche de *Bac. vulgaris* ou peut-être de *Bac. mesentericus*; aux recherches de SCHOBER [34] sur un pouvoir azoto-fixateur déjà tant de fois démenti [35] de l'*Asperg. niger*: aux recherches de MOORE et WEBSTER [36], de DREWES [37], de ALLISON et MORRIS [38] sur le pouvoir azoto-fixateur, également démenti avec certitude [9,35] des *Cyanophyceae* cultivées durant 2 ou 3 mois dans des solutions minérales exposées à l'air. On doit aussi remarquer que la nouvelle affirmation de RAYNER [39] concernant le pouvoir azoto-fixateur de *Phoma radicis callunae* (le champignon qui vit en symbiose avec *Calluna vulgaris*) est dépourvue de toute démonstration certaine, tandis que MELLIN [40] a rejeté, encore une fois, l'hypothèse que les mycorrhizes puissent assimiler l'azote élémentaire.

D'autres recherches existent enfin, dont les conclusions étranges dépassent toute explication possible, même en admettant les erreurs de technique les plus grossières. Que pouvons nous dire, par ex., des résultats rapportés par CLAUSEN [31] à propos de l'activité d'un ferment butyrrique (*Amylobacter navicula*) tout à fait semblable au *Bac. amylobacter* commun, mais capable d'attaquer activement la cellulose et qui, cultivé pendant 20 jours à 37° dans du liquide de Winogradsky avec 1 ‰ de destrose, 3 ‰ de cellulose chimiquement pure et 10 ‰ de craie, en aurait élevé le contenu primitif en azote de 0.3 ‰ jusqu'à 3.1 ‰? Il est inutile de remarquer qu'une telle affirmation, c'est-à-dire qu'un gramme de sucre et 3 grammes de cellulose, puissent avoir déterminé une fixation de presque 3 grammes d'azote, ne trouve de fait correspondant même éloigné, dans aucune des si nombreuses recherches exécutées jusqu'à présent sur les rapports énergétiques qui règlent la fonction des azoto-fixateurs les plus communs, et ne présente aucun caractère de vraisemblance.

En résumé, les travaux les plus récents ne servent donc qu'à renforcer considérablement l'opinion que j'ai déjà manifestée [42]: les affirmations relatives au pouvoir azoto-fixateur de beaucoup de microbes communs du sol ne méritent qu'une confiance très limitée.

L'opinion émise récemment par WINOGRADSKY [33] est concordante. Tout en n'excluant pas complètement une activité des germes qu'il appelle les fixateurs artificiels (microbes qui dans des conditions particulières de culture pure auraient un certain pouvoir azoto-fixateur, attribuable peut-être à des actions catalytiques propres à tout corps plasmatique), il pense qu'une importance réelle dans le phénomène naturel de l'azoto-fixation doit être reservée à ces microbes qu'il appelle fixateurs naturels. « Quant à ces derniers, dit W., le seul moyen de les déceler dans le sol est la culture élective, soit l'ensemencement de la terre dans un

milieu approprié, dépourvu d'azote combiné. On s'est tenu à cette méthode dès les premières recherches sur les fixateurs il y a trente ans, et depuis on se heurtait toujours dans des experiences innombrables à ces deux groupes de fixateurs naturels; et ce n'est qu'en procédant à des isolements, ou en utilisant les cultures pures, qu'on arrivait à ces fixateurs artificiels. Le malentendu qui a subsisté tant d'années concernant le rôle de ces derniers dans la nature, est donc difficile à comprendre ».

IV. — Les azotobacters.

En considerant les microrganismes peu nombreux dont l'aptitude à fixer l'azote moléculaire (tout au moins quand ils vivent dans des milieux nutritifs convenables, dépourvus d'azote combiné assimilable) ne saurait être mise en doute, nous exposerons, avant tout, les résultats de nombreuses recherches dont a été l'objet, au cours des 10 au 12 dernières années, le groupe des Azotobacters; une partie de ces recherches constitue un véritable progrès dans notre connaissance de ces microbes.

A propos des méthodes pour la culture et l'isolement du sol des *Azotobacter*, on doit rappeler qu'Omeliansky (1) d'abord, et Skinner (43) ensuite, auraient trouvé utile de remplacer par le dextrose la mannite généralement employée dans la préparation de la gélose; on éviterait ainsi plus facilement le développement des colonies étrangères, et la pigmentation de l'*Azotob. chroococcum* se manifesterait plus rapidement et avec plus d'intensité. Mais cette petite particularité et quelques autres semblables modifications du procédé indiqué par Beijerinck (44), et qui est resté jusqu'ici d'un emploi général malgré ses imperfections évidentes, ont perdu beaucoup de leur intérêt depuis les récents travaux de Winogradsky (45).

Je ne fais pas allusion ici à l'examen microscopique direct du terrain décrit par Winogradsky et basé, comme l'on sait, sur la dissociation des éléments de la terre par des suspensions dans l'eau, centrifugations, décantations, etc. Comme ceux qui furent proposés avant ou après, ce procédé microscopique peut seulement servir pour une simple étude d'orientation sur le contenu microbien total du terrain. Winogradsky a noté que certains grands coccus, très communs dans les préparations microscopiques, rassemblent à des Azotobacters et que, probablement, quelques uns d'entr'eux représentent la forme originaire de l'espèce cultivée. Certains auteurs ont voulu, au contraire, considérer comme Azotobacters tous ces coccus; et nous verrons sous peu que cette identification trop hâtive, les a amenés à des conclusions bien erronées. Il ne semble pas, d'ailleurs, qu'on puisse attribuer trop de valeur à l'examen microscopique du terrain, précédé, d'après les indications de Winogradsky, par ce qu'il appelle les cultures spontanées, obtenues en mélangeant la terre

avec de la mannite ou avec tout autre matériel énergétique, apte à favoriser la pullulation des Azotobacters.

Bien plus grande est l'importance des deux autres procédés proposés par WINOGRADSKY pour la culture des *Azotobacter*, pour leur isolement du sol, pour leur dénombrement et pour la démonstration et l'évaluation sûre de leur activité fixatrice. Le premier d'entr'eux, c'est-à-dire le procédé dit des plaques de terre moulée, consiste à mélanger soigneusement la terre à examiner avec 1% de mannite ou de glucose, au avec 5% d'amidon; on y ajoute peu à peu de l'eau distillée jusqu'à rendre plastique la masse avec laquelle on remplit complètement une boîte de Petri, en comprimant légèrement au moyen d'une lame de verre humectée jusqu'à obtenir une surface bien lisse. Après 48 heures d'incubation dans un milieu suffisamment humide, si la terre ne manquait pas de fixateurs aérobies, on remarque sur la surface de la plaque l'apparition de petites colonies hyalines ou blanchâtres, de 1 à 2 mm. de diamètre, qui, durant les jours qui suivent, s'agrandissent un peu et prennent l'aspect de taches brunes caractéristiques. D'après WINOGRADSKY elles sont constituées par des *Azotobacter*, s'étant développés à un état de remarquable pureté; les Clostridiums anaérobies pourraient se multiplier à l'intérieur de la terre sans former des colonies visibles; c'est seulement lorsqu'on augmente la plasticité de la terre, par l'addition préalable d'une forte dose de kaolin lavé, qu'on obtient la formation sur la plaque de petits mamelons, qui cachent des cavités contenant des colonies de *Clostridium* à l'état pur. CASTELLI [46] par contre, aurait observé que, même dans les plaques préparées suivant la technique indiquée pour le développement des aérobies, l'apparition est très fréquente de colonies plus ou moins soulevées, blanchâtres, à bulles, dues à un développement symbiotique d'*Azotobacter* et de *Clostridium*, avec prédominance de l'un ou de l'autre, selon les conditions physico-mécaniques du matériel examiné. Les Clostridiums se développeraient en particulièrement grand nombre dans les terrains compactes et en présence de forte humidité, tandis que dans les terrains délayés et bien aérés les colonies seraient formées surtout d'Azotobacters. Quoi qu'il en soit, cette méthode n'est certainement pas la plus appropriée à l'isolement et au dénombrement des *Azotobacter* du sol; mais elle peut donner une bonne idée du contenu total en azoto-fixateurs. Elle est surtout indiquée lorsqu'il s'agit d'établir si la constitution physico-chimique du terrain est favorable, ou non, au développement de ces microrganismes. On en a fait quelques applications pratiques intéressantes, dont nous reparlerons ensuite.

La terre pétrie avec une quantité d'eau suffisante, avec 2% de mannite et 0,1 à 0,2% de phosphate potassique, distribuée dans des tubes et stérilisée pendant 20' a 120°, représente également, selon WINO-

GRADSKY, un excellent milieu pour le développement et la conservation des cultures des Azotobacters.

Mais il faut attacher une importance toute particulière à la partie des études de WINOGRADSKY relative à la méthode de culture des Azotobacters sur plaques de silico-gel. Par ce procédé ces microrganismes ont pu être, pour la première fois, directement et très facilement isolés du terrain; il a été possible d'en évaluer le nombre avec une exactitude beaucoup superieure à celle des très imparfaites méthodes de dénombrement par délaiement, auxquelles on avait recours jusqu'à présent, faute de mieux. Cette méthode peut être ainsi résumée, d'après la plus récente description que WINOGRADSKY en a fait: On mélange une solution pure et incolore de silicate de soude, étendue jusqu'à 9° B.^e environ, avec un volume égal d'acide chlorhydrique dilué à 13° B.^e, en versant le silicate dans l'acide; on porte 30 cmc. du mélange en boites de Pétri de 9-10 cm. de diamètre. Ces boites après 24 heures ou plus, quand le contenu est devenu bien solide et vibrant à la percussion, sont lavées pendant deux ou trois jours à l'eau courante. On les soumet ensuite à des lavages répétés à l'eau distillée jusqu'à disparition de la réaction du chlore dans l'eau de lavage. Le support ainsi préparé doit être imprégné d'une solution nutritive convenable, ainsi constituée: Eau distillée 200, phosphate monopotassique 1, sulfate de magnésie 0,5, chlorure de sodium 0,5, sulfate ferreux 0,02, sulfate de manganèse 0,02. Pour chaque plaque on doit prendre 2 cmc. de ce liquide; on y ajoute 0,2-0,3 gr. de carbonate de chaux en poudre et 0,5 gr. de mannite (ou bien 0,1 gr. de benzoate de soude); on porte le pH du mélange à 6,8-7,2 par adjonction d'une solution de potasse à 2%, on ajoute un peu d'eau distillée, on chauffe jusqu'à l'ébullition et l'on verse le liquide bouillant sur la plaque qu'on laisse ouverte sur la plaque metallique de l'étuve Roux pendant plusieurs heures jusqu'à l'évaporation du liquide. Pour l'ensemencement, on emploie des grains de terre obtenus en passant l'échantillon séché à l'air à travers un tamis à mailles d'un millimètre. Un certain nombre de grains, correspondant à 0,1-0,2 gr. de terre, sont disposés à la surface d'une plaque de 10 cm. de diamètre; un plus grand nombre sur les plaques plus grandes. Après 48 heures à 28°-30°, les colonies des Azotobacters apparaissent comme de petits disques muqueux, plus ou moins en relief, qui ont pour centre un grain de terre et qui atteignent vite et même dépassent un demi centimètre de diamètre. Le plus souvent elles constituent la seule végétation importante sur les plaques; quelques fois on trouvera aussi les colonies, très faciles à différencier, de quelques schizomycètes oligazophiles, comme l'on a déjà dit au § II. Dans une période avancée de développement, c'est-à-dire au 4e-5e jour, lorsque les colonies tendent à confluer, les fixateurs anaérobies paraissent aussi, comme de petits ilôts de bulles

gazeuses, qui s'étendent plus ou moins rapidement. Cet inconvénient est probablement causè, ou du moins très favorisé, par la méthode d'ensemencement des plaques avec les grains de terre, qui est évidemment la plus apte pour le développement symbiotique des fixateurs aérobies et anaérobies.

DE ROSSI (20), tout en confirmant la valeur très remarquable de cette méthode, pense qu'on peut y apporter certaines modifications la rendant plus facile et plus simple d'exécution et donnant des résultats plus sûrs et plus exactes, aussi bien pour l'isolement et l'étude des Azotobacters, que pour leur évaluation quantitative. Il conseille de remplacer le silico-gel avec de la gélose et d'ensemencer les plaques non pas avec des grains de terre, mais avec des suspensions de terre à des dilutions progressivement croissantes. On ajoute à de l'eau de source 1,5% de gélose finement coupée; on chauffe ensuite à feu direct et on fait bouillir pendant 15'. Le liquide encore chaud est versé dans de petits ballons de la capacité d'environ 300 cmc. et chacun d'eux, après 3 heures de cuisson et de stérilisation simultanée à 100° à la marmite de Koch, pourra servir pour la préparation de 10-12 plaques de 9-10 cm. de diamètre. A peine solidifiée la gélose peut recevoir la solution nutritive, qui est celle indiquée par WINOGRADSKY. Un volume donné du liquide minéral dont on vient de donner la formule, avec un pH égal à 7 environ, est dilué avec un volume égal d'eau distillée; on y ajoute 12% de mannite et 5% de carbonate de chaux en poudre; on fait bouillir 3 minutes et on porte, au moyen d'une pipette graduée, 5 cmc. du mélange sur chaque plaque. On laisse les capsules découvertes en étuve à 40°-45° jusqu'à ce que la surface de la gélose apparaisse bien sèche. Pour l'ensemencement on prépare, avec les précautions ordinaires, une suspension de terre en eau de source stérilisée, dans la proportion de 1/80, en agitant à plusieurs reprises le mélange pendant une demie heure. Dans le cas d'analyse des terrains agraires normaux, où le nombre des Azotobacters n'est jamais très élevé, il suffira que de cette première diluition on en prépare une seconde à 1/800. Mais quand on veut dénombrer les Azotobacters existants dans une culture ou dans le terrain ou l'on aie artificiellement excité leur pullulation, il faudra préparer encore deux diluitions à 1/80.000 et à 1/800.000. De chaque diluition on étale 0,7 cmc. à la surface des plaques de gélose, en répartissant le liquide d'une manière uniforme. Il est facile d'en éloigner l'excés, en tenant les plaques découvertes à l'étuve, pendant une demie heure. Au bout de 48 heures d'incubation à 30°, on procède à l'examen des cultures, qui doit être répété aussi le 4e et le 6e jour, soit pour tenir compte de l'apparition éventuelle de colonies tardives, soit pour relever l'aspect caractéristique des colonies développées, en évitant par là toute confusion possible entre les colonies des *Azotobacter* et celles d'autres microbes oligazophiles éventuellement présentes.

Aussi bien sur les plaques de silice que sur celles de gélose ensemencées avec des terres d'origines les plus variées, les colonies des Azotobacters se présentent généralement (quoique avec une fréquence différente), selon trois types bien distincts ([19], [20]): colonies fluides (gouttes d'un mucus peu épais, à peine trouble), colonies sèches (végétations sèches, membraneuses, ridées, à contour irrégulier), colonies bombées (gouttes muqueuses très en relief, assez consistantes). En vieillisant ces cultures montrent d'autres différences, dues spécialement à l'apparition de pigmentations variées.

Une étude ultérieure, plus profonde et systèmatique des caractères différentiels des colonies et des cultures des *Azotobacter* sur silice ou gèlose imprégnés avec du liquide de WINOGRADSKY, serait très désirable pour mieux établir l'existence réelle des différentes espèces décrites jusqu'à présent. A ce point de vue l'état de nos connaissances est à peu près comme il y a vingt ans; on doit seulement rappeler que selon LÖHNIS et SMITH ([47]) *Azotob. Beijerincki* et *Azotob. Smyrni* devraient s'identifier avec *Azotob. chroococcum*; *Azotob. vitreum* serait une forme incolore et immobile de l'*Azotob. agile*, fluorescent et mobile. Qu'y a-t-il de vrai en tout cela?

L'étude morphologique et culturale des Azotobacters a bien peu progressé. La fantaisie de quelques chercheurs s'est cependant donné libre cours aux dépens de ces microbes pour lesquels on a bâti les cycles de développement les plus étranges.

JONES ([48]), le premier, a distingué dans les cellules des *Azotobacter* deux sortes de granulations: quelques unes qui ne prennent pas les colorants ordinaires et à qui la solution iodo-iodurée donne la teinte rouge-brun propre au glycogène, d'autres facilement colorables qu'on devrait considérer comme des corps reproducteurs ou gonides, qui, à la suite d'une désintégration de la cellule mère seraient mis en liberté pour se développer ensuite en cellules normales d'Azotobacters. Ces gonides seraient mobiles et pourvus de cils; mais les figures que Jones rapporte à ce propos sont très peu démonstratives, et ne permettent pas du tout d'exclure l'hypothèse que les prétendus cils des gonides soient, au contraire, de simples filaments de mucus ou des cils détachés des cellules des Azotobacters.

BONAZZI ([49]) a soutenu la nature purement métachromatique des granules des Azotobacters, en excluant qu'ils aient une tendance quelconque à la reproduction. SCHMIDT ([50]), ISSATSCHENKO et GILJAROWSKI ([51]) sont aussi d'avis que les inclusions des Azotobacters ne sont que de simples grains de volutine; STAPP ([52]) les considère comme constituées les unes de volutine, les autres de graisses.

LÖHNIS et SMITH ([53]), se basant sur de simples observations micro-

scopiques, n'hésistent pas à attribuer aux Azotobacters jusqu'à 7 formes de développement. En effet, en dehors des grandes cellules non sporogènes que chacun peut observer dans les cultures jeunes d'*Azotobacter* en terrains nutritifs convenables (c'est-à-dire quand l'emploi d'un milieu de culture impropre, ou le vieillissement des cultures n'a pas donné lieu à ces altérations morphologiques qu'on voit d'ordinaire chez les microrganismes dans des conditions anormales de milieu), ces auteurs affirment avoir régulièrement observé deux phases de développement en coccus, trois en bacilles et une fungoide, toutes transformables l'une dans l'autre. Les formes bacillaires, quelques unes avec et d'autres sans spores, seraient identiques ou très proches du *Bact. lactis viscosum*, du *Bac. luteus*, du *Bac. malabarensis*, du *Bac. danicus*; la forme fungoide serait aussi attribuable à des espèces déjà connues, c'est-à-dire à *Mycobact. luteum*, à *Mycobact. lacticola*, à *Mycobact. album!* Il existerait, en outre, plusieurs formes de cellule régénératives: des endospores et des exospores bacillaires, des gonides, des gonidanges, des artrospores, microcystes, etc. Comme point de départ et de croisement des différents stades, fonctionne le symplasme, c'est-à-dire une masse plasmatique amorphe, dérivant de la fusion de cellules de nature variée et par qui toutes les formes cellulaires décrites peuvent à leur tour être reproduites, parfois après une période de repos. Et finalement LÖHNIS et SMITH ont aussi vu des phénomènes de conjonction cellulaire dans les cultures jeunes des Azotobacters.

NIEMAYER (54) a nié l'existance du symplasme, mais il a admis les conjonctions cellulaires sans en donner toutefois une démonstration convaincante: en outre, il aurait observé non seulement la libération des granules à la suite de la destruction des cellules microbiennes, mais aussi le passage de ces mêmes granules de l'intérieur à l'extérieur de cellules normales. Les conjonctions cellulaires, l'existence du symplasme et la sortie des granules endocellulaires ont été confirmées par WILK et ZIEGENSPECK (55); ces auteurs affirment aussi que les granules ont des mouvements actifs et peuvent adhérer à d'autres cellules; ils les considèrent comme des parasites capables de passer d'une cellule à une autre, c'est-à-dire comme de véritables bactériophages. L'*Azotobacter* aurait donc ainsi le mérite de nous avoir montré pour la première fois le bactériophage de d'Hérelle, si longtemps recherché et toujours en vain!

Un cycle de développement des Azotobacters différent de celui de LÖHNIS, mais qui ne mérite probablement pas plus de confiance, a été decrit par PETSCHENKO (56). Les kystes, qui sont des formes globuleuses avec une capsule épaisse, montrent (dans des conditions appropriées de nourriture) des gemmations ovales, qui se convertissent bientôt dans des formes bacillaires péritriches: celles-ci se reproduisent par scission et se transforment en des formes globuleuses également péritriches, capables

de se diviser selon une, deux, ou trois directions. Après une série de divisions semblables, des formes amiboides paraissent, susceptibles de se multiplier et se transformant enfin en kystes ou bien en gonides, c'est-à-dire en corpuscules ronds extrèmement petits qui, s'entourant d'une capsule épaisse, deviennent des microcystes. Aussi bien les kystes que les microcystes portées sur des terrains nutritifs frais reproduisent le cycle de développement décrit.

Il n'est pas facile de dire si et jusqu'à quel point l'interprétation arbitraire d'apparences microscopiques trompeuses (à mettre en rapport avec des phénomènes d'autolyse très évidents dans les vieilles cultures), ou bien encore l'examen de cultures impures (contenant soit des germes de schizomycètes sporogènes ou non sporogènes, soit des protozoaires restés inertes au début de la culture par manque d'azote mais capables ensuite de se développer aux dépens de l'azote assimilè par les Azotobacters), peuvent expliquer ces hypothèses compliquées et tout artificielles. Ces hypothèses sont certainement destinées à tomber à la suite de recherches plus soignées, exécutées avec une technique correcte et guidées par un esprit critique sévère.

Nous pouvons déjà signaler le fait que RICCARDO (28) a nié la formation des spores, ainsi que l'existence du symplasme, etc., gardant seulement l'interprétation qu'on avait fait pour les corpuscules sphériques endocellulaires, comme des formes de gonides; que BEAUVERIE (57) a également nié l'existence de la plupart des formes décrites par LÖHNIS et a démontré que le symplasme est le résultat d'artifices de préparation; que DE REGEL (58) tout en attribuant dans le processus de reproduction des *Azotobacter* une certaine importance aux granules dont il aurait observé, dans des préparations en goutte pendante, la transformation en formes cellulaires normales, n'admet pas l'apparition d'autres formes reproductives, ni la manifestation du processus de conjonction, ni la production du symplasme. En dehors des gros bacilles connus et des coccus réunis en courte chaîne ou en sarcine, les cultures des Azotobacters ne pourraient contenir (suivant DE REGEL) que quelques formes d'involution, et en de certains cas aussi des cellules durables, à membrane grossie, sans toutefois que celles-ci constituent en quoi que ce soit un stade nécessaire dans le cycle de vie de l'espèce microbienne.

Quelques auteurs ont étudié la substance muqueuse que certains Azotobacters produisent abondamment dans les cultures solides. Selon STAPP (59) c'est un hydrate de carbone, dépourvu d'albumine et de mucine, qui par inversion donne un sucre dextrogyre fermentescible; selon SANBORN et HAMILTON (60) c'est un arabane avec des traces d'azote. La présence de composés protéiques augmente sa production, quoiqu'elle ne soit pas nécessaire (61).

La coloration noire de l'*Azotob. chroococcum* dépend, selon RIPPEL et LUDWIG ([62]) de la production endocellulaire de mélanine.

De nouvelles expériences ont été faites sur l'activité fixatrice des cultures pures des Azotobacters. HUNTER ([63]) a vu qu'une longue aération exalte aussi bien les fonctions végétatives de ces microbes, que leur capacité fixatrice, et que le dextrose et l'acétate de potasse donnent lieu à une fixation d'azote (jusqu'à 18,72 mg. pour 1 gr. de dextrose consommé), quelque peu supérieure à celle déterminée par la mannite. BRADLEY et FULLER ([64]) chez plusieurs espèces isolées du terrain ont obtenu la fixation de 10 à 16 mg. d'azote pour 100 cmc. de liquide d'Ashby. WINOGRADSKY ([65]) dans les cultures d'Azotobacters sur plaques de silice a constaté un gain en azote correspondant à 9-11 mg. pour chaque gramme de matière énergétique (glucose ou mannite) contenue dans le milieu de culture, avec un rapport entre l'azote fixé et le carbone consommé sensiblement voisin de 1: 40.

On a largement discuté ces derniers temps plusieurs théories relatives au mécanisme de fixation de l'azote de la parte des Azotobacters. La combinaison directe de l'azote avec des composés organiques, depuis longtemps soutenue par GERLACH et VOGEL ([66]) et par HEINZE ([67]), savoir la formation de composés ammidiens primaires par union de l'azote libre et des constituants organiques des cellules microbiennes, a été admise ensuite aussi par LIPMANN ([68]). D'après STAPP ([69]) la question que l'azote puisse ou non se combiner à des composés organiques par réaction directe, n'est pas encore résolue. BLOM ([70]), au contraire, considère cette hypothèse comme invraisemblable.

La théorie d'ASO et LOEW ([71]) de l'hydrolyse primaire de la molécule de l'azote, c'est-à-dire de la fixation de l'azote par une réaction inverse à celle de décomposition du nitrite d'ammoniaque



$$NH^4 NO^2 \rightleftarrows N \equiv N + 2H^2 O$$

avec utilisation immédiate de l'ammoniaque produite, alors que l'acide nitreux servirait aussi, après réduction, pour la construction d'ammino-acides, n'a pas trouvé d'autres partisans.

Une autre vieille hypothèse est celle de l'oxydation primaire de l'azote, avec production d'oxyde d'azote ou d'acides azotés oxygènés. Proposée par GAUTIER et DROUIN ([72]) pour les fixateurs aérobies, elle a été récemment reprise par BURK ([73]) pour les anaérobies, mais elle est combattue par BLOM ([70]). On doit rappeler à ce propos que depuis 1903 BONNEMA ([74]) en soutenant son opinion que la fixation dans le terrain est essentiellement un processus chimique et non biologique, a rapporté des expériences d'oü il semblait resulter que, par l'action catalytique de l'hydroxyde de fer, l'azote est d'abord oxydé en acide nitreux, que

les microbes du sol reduiraient ensuite en ammoniaque, employée pour la construction des amino-acides. Mais SESTINI [75] a ensuite démontré que ce n'est pas l'azote élémentaire, mais l'ammoniaque dont l'air des laboratoires contient des traces assez fortes, qui subit l'oxydation en acide nitreux, en présence de l'hydrate ferrique; par conséquent, le phénomène mis en évidence par Bonnema ne consisterait pas en un gain en azote assimilable, mais en une transformation d'une forme d'azote assimilable dans une autre. Il ressort d'autres recherches [76, 77], qu'aucune trace de nitrites n'est décélable même avec les moyens de recherche les plus sensibles, dans les cultures des Azotobacters.

Une quatrième théorie est celle de la réduction primaire de l'azote moléculaire. Déjà, en 1894, WINOGRADSKY [78] avait émis l'opinion que les Clostridiums anaérobies produisent de l'ammoniaque par combinaison de l'azote avec l'hydrogène naissant, qui dérive de la fermentation butyrrique qu'ils déterminent. STOKLASA [79] attribuait une importance analogue à l'hydrogène dont il avait constaté la formation dans les cultures des Azotobacters; mais OMELIANSKI et SIEBER [80] ont nié que dans les cultures pures d'*Azotobacter* il puisse se produire de l'hydrogène. Peut-être STOKLASA avait-il expérimenté avec des cultures impures. Plus tard WIELAND [81] a considéré la fixation microbienne de l'azote comme un phénomène biologique analogue à la synthèse de l'ammoniaque par le procédé HABER; la molécule $N \equiv N$ fonctionnerait comme accepteur pour l'H, avec qui elle forme de l'ammoniaque avec production intermédiaire de diimmide et d'hydrazine:



$$N \equiv N + 2\,H \longrightarrow HN = NH + 2\,H \longrightarrow H^2N - NH^2 + 2\,H \longrightarrow 2\,NH^3.$$

A cette opinion se sont associés aussi KOSTYTCHEW, RYSKALTSCHUK et SCHWEZOWA [77]. MEYERHOF et BURK [82] affirment tout simplement qu'une formation primaire d'ammoniaque dans la fixation microbienne de l'azote est très vraisemblable. BLOM [70], tout en voyant dans le phénomène un processus de réduction, estime qu'il est précédé par une réaction d'hydratation favorisée par la présence d'un catalysateur contenant du fer, avec production d'hydrossilammine. Les plus récentes observations de WINOGRADSKY [83] mettent hors de doute que l'ammoniaque représente bien le premier stade dans le processus d'organisation de l'azote élémentaire, sous l'action des Azotobacters; à la suite de leur développement sur plaques de silico-gel au lactate ou au succinate de sodium (à la place de la mannite) on note une production d'ammoniaque si abondante, que non seulement les essais chimiques mais tout simplement l'odorat rendent cette production manifeste.

En ce qui concerne les rapports entre l'azotofixation et l'utilisation d'aliments énergétiques, les recherches de WINOGRADSKY [35] ont con-

firmé que les Azotobacters dans les cultures artificielles tirent profit non seulement des sucres, mais aussi de beaucoup d'acides organiques, alcools, etc. (surtout des lactates, succinates, malates, acétates, tartrates, benzoates, citrates, alcool éthylique, butylique, glycérine). Par contre, nos connaissances sur l'utilisation des substances existant dans le terrain restent encore très imparfaites.

Une tentative faite par LIPMAN et TEAKLE [84] pour démontrer précisément que les matières energétiques du sol peuvent pourvoir aux nécessités de la fonction fixatrice des Azotobacters n'a pas démontré grand chose. Les Azotobacters ont été ensemencés dans une simple solution de terrain et dans le terrain même qui avait servi pour la solution, sans addition de substances hydrocarbonées; et puisque il n'a été démontré aucunement que ces microbes se sont multipliées dans le liquide ou dans la terre, on a le droit de douter qu'un développement se soit réellement vérifié. Cependant, après quelques semaines d'incubation à 28°-29°, on aurait constaté des gains en azote, sur la base desquels le rendement énergetique du carbone contenu dans le terrain (en grande partie sous une forme non utilisable par les Azotobacters), paraîtrait égal, sinon supérieur, à celui du carbone du sucre, de la mannite et d'autres matériels semblables, les plus facilement assimilables par les microbes azotofixateurs.

En concordance avec les résultats des vieilles recherches de PRINGSHEIM [85] pour les Clostridiums anaérobies, TUORILA [86] et SKINNER [87] admettent que les produits de décomposition de la cellulose peuvent servir comme source d'énergie pour les Azotobacters; d'autre part, SANBORN et HAMILTON [88, 60] affirment que la présence de ces microbes a une action stimulante sur les microbes destructeurs de la cellulose. Mais les recherches de ces auteurs sont bien loin de fournir une démonstration positive de la possibilité pour la cellulose du terrain de représenter la source d'énergie nécessaire pour la fonction fixatrice des Azotobacters.

Une expérience de TRUFFAUT et BEZSSONOFF [89], d'après laquelle des plantes de mais auraient pu se développer régulièrement et arriver à maturation, avec des gains de 0,22 à 0,58 gr. d'azote, dans du sable calciné et lavé, absolument dépourvu d'azote et de matière organique, ensemencé d'Azotobacters en mélange avec d'autres microbes fixateurs aérobies et anaérobies (dont les besoins en matériel énergétique auraient été satisfaits complètement par les sécrétions radicales du mais), n'ont pas été confirmées par d'autres expériences exécutées ultérieurement par les mêmes auteurs [90]. Il est donc superflu de discuter sur le peu de vraisemblance que les microbes fixateurs se soient réellement développés dans les conditions décrites ci dessus (et les auteurs cités n'en ont donné aucune démonstration), du moment que le fait lui-même de la coopé-

ration immédiate et exclusive entre les bactéries et les plantes supérieures, n'a pas été prouvé avec certitude.

Par contre, l'action utile des algues sur le développement et l'activité des Azotobacters, a été nouvellement confirmée par LIPMAN et TEAKLE [91] et par SCHROEDER [92] dans leurs recherches sur le développement d'*Azotobacter* et de *Chlorella* dans des solutions minérales dépourvues d'azote, et par CENGIA-SAMBO [93] dans ses études sur la symbiose d'*Azotobacter* et *Cyanophyceae* dans les céphalodes de certains lichens.

Par un mécanisme surement très différent, mais pour le moment un peu obscur, la symbiose avec les protozoaires exerce aussi une action utile sur les *Azotobacter*. On sait que dans les cultures liquides ou solides de ces microbes, obtenues du terrein, on a très facilement un développement simultané de protozoaires et spécialement d'amibes, pour lesquelles les Azotobacters représentent un aliment très convenable. WINOGRADOW [94] a montré que, par quelques passages en gélose de Beijerinck, où les autres microbes poussent mal, il est facile d'obtenir une culture pure mixte d'Azotobacters et d'amibes. Le même résultat est atteint encore plus facilement avec les plaques de silice à la mannite [95]. Mais plusieurs chercheurs ont aussi établi [96, 97, 98, 99] que la présence des protozoaires stimule l'énergie de développement des Azotobacters et détermine une certaine augmentation de la quantitè d'azote fixée, aussi bien dans les liquides de culture, que dans le terrain.

Toujours à propos du processus de nutrition des Azotobacters, on doit rappeler ici quelques recherches intéressantes relatives à la conduite de ces microrganismes cultivés en présence d'azote combiné. Ces recherches pourraient contribuer à modifier notablement nos conceptions actuelles sur l'importance de l'activitè naturelle de ce groupe microbien. On sait, depuis longtemps [100, 101, 102, 103, 104] que l'assimilation de l'azote élémentaire ne représente pas un phénomène absolument nécessaire dans le processus nutritif des Azotobacters, qui sont, par contre, capables d'utiliser l'azote combiné et spécialement celui des sels d'ammoniaque, des nitrates et de quelques composés organiques. De tels composés se montreraient plus facilement assimilables que l'azote élementaire et, par suite, leur présence donnerait lieu à un affaiblissement plus ou moins prononcé du pouvoir azoto-fixateur des microrganismes. HILLS [105] a observé que l'addition de petites doses de nitrate de soude aux milieux dépourvus d'azote, employés pour la culture des Azotobacters rendait plus de 30 fois plus actif le développement des cellules bacteriennes et seulement 3-5 fois plus grande la fixation de l'azote. WINOGRADSKY [33] a reconnu que dans les cultures d'*Azotobacter* sur plaques de silice la fixation de l'azote est réduite à zéro par addition de nitrates dans une proportion correspondante à 1,5 pour 100 de mannite.

Bonazzi [106], qui a effectué d'importantes recherches sur la question, admet que les Azotobacters sont capables de fixer de notables quantités d'azote dans les expériences de laboratoire exécutées dans des milieux de culture dépourvus d'azote combiné ou très pauvres; il est d'avis pourtant que cette activité s'explique d'une manière très limitée dans le terrain. Ici, en présence de composés azotés facilement utilisables, le matériel énergétique mis à la disposition des *Azotobacter* servirait surtout pour utiliser ces composés. La fonction la plus utile des Azotobacters dans le sol consisterait donc dans l'assimilation des nitrates qui, de cette manière, seraient soustraits à l'activité des microbes dénitrifiants et aux pertes par lavage du sol. L'organisation de l'azote moléculaire ne peut pas être éliminée totalement, mais elle représenterait un phénomène non constant et d'importance secondaire. A ces vues se sont associés, ces derniers temps, Zoond [107], Kostytschew, Ryskaltschuck et Schwezowa [77], Burk et Lineweaver [108], Fuller et Rettger [109], Curie [110]. Leurs recherches confirment avec certitude: 1°) que les Azotobacters ne peuvent tirer qu'un parti limité de l'azote des composés organiques plus complexes qui n'ont que peu d'influence sur leur activité; 2°) que l'azote de la peptone, des aminoacides plus simples, des nitrates et de l'ammoniaque est très facilement assimilé, avec un développement plus fort et plus rapide des *Azotobacter* et une diminution (au sens relatif et au sens absolu) de leur pouvoir fixateur; 3°) que l'azoto-fixation n'est pas une fonction essentielle du métabolisme des Azotobacters; elle se manifeste seulement quand il y a insuffisance d'azote combiné utilisable.

On a encore continué les études sur les autres conditions qui règlent le développement et l'activité des Azotobacters; mais, le plus souvent, avec des résultats qui ne font que confirmer ce que l'on savait déjà. Comme optimum de réaction pour les Azotobacters dans les cultures, Krishna [111] a indiqué pH = 6,3-8,4, et comme acidité limite pH = 5,8-5,9. Avec ces chiffres concorde l'absence d'Azotobacters dans les terrains à pH inférieur à 6 qui a été constatée par Gainey et Batchelor [112] par Gainey [113], et par Curie [110].

De nouvelles preuves (bien qu'elles ne soient toutes parfaitement convaicantes) ont été données de la notable résistence des *Azotobacter* à la dessication et aux basses températures. Omeliansky [114] aurait trouvé encore vivantes des cultures d'*Azotob. chroococcum* sur gélose dextrinée, gardées pendant 10 ans à l'état sec. Niklas et Poschenrieder [115] ont obtenu un développement d'*Azotobacter* non seulement d'un terrain desseché à l'air et conservé pendant 190 à 330 jours, mais aussi d'échantillons de terre conservés pendant 28 ans en récipients fermés. Gibbs et Batchelor [116] 47 fois sur 60 essais de terre de bruyère ensemencée avec l'*Azotobacter*, l'ont trouvé encore vivant au bout de 18 mois.

Aucune action n'a été notée par DEMOUSSY [117] après une exposition même très prolongée des Azotobacters à —13°.

KIESSLING [121], confirmant les précédentes recherches de LÖHNIS et PILLAI [118], de KRZEMIENIEWSKI [119], de MAASSEN et BEHN [120] a observé des variations évidentes du contenu en Azotobacters du terrain selon les saisons, avec deux maxima, l'un au printemps, l'autre en automne, et deux minima, en été et en hiver; l'activité totale de toute la microflore du sol présentait des variations parallèles. GRAEF [122] a observé le maximum d'activité de fixation de la part des Azotobacters en juin, et de la part des Clostridiums en juillet.

L'action stimulante bien connue de la terre, de son extrait et des composés humiques a également trouvé de nouvelles confirmations. Nous rapportons ici quelques données acquises à ce sujet; mais non sans rappeler ce que l'on a dit au § II, concernant la probabilité d'erreurs résultant de l'introduction de composés azotés avec la terre et ses extraits.

Selon VOICU [123] l'addition de petites doses d'humus aux cultures d'*Azotob. chroococcum* (0,5-5 mg. en 100 cmc. d'une solution sucrée au 2%) stimule la fixation de l'azote sans varier le rapport avec la quantité de sucre consommé, alors que de plus fortes doses (100-200 mg. pour 100 cmc. de liquide) augmentent considérablement aussi le rendement énergétique du sucre. KOSTYTSCHEW, RYSKALTSCHUK et SCHWEZOWA [77] par addition de terre de jardin aux cultures des Azotobacters auraient obtenu des gains en azote atteignant 25 mg. par chaque gramme de sucre consommé. BIRSCH HIRSCHFELD [124] a constaté qu'une action analogue de l'extrait de terre sur le développement et sur l'activité des *Azotobacter* se manifeste non seulement quand ils doivent assimiler l'azote élémentaire, mais aussi lorsque l'azote leur est fourni sous forme de nitrates.

L'importance du calcium comme facteur limitant le processus de fixation dans le terrain et la présence des Azotobacters a été mise en relief encore une fois par NIKLAS et POSCHENRIEDER [115] et par DIANOWA et WOROSCHILOWA [125]. Selon BURK et LINEWEAVER [126] la présence de calcium ou de strontium en concentration relativement élevée (0,025-0,05 °/₀₀) dans les milieux ordinaires de culture n'est pas essentielle pour le développement des Azotobacters, mais plutôt pour leur fonctionnement normal au point de vue de l'activité fixatrice; quand la concentration de ces éléments est réduite à 0,001-0,005 °/₀₀, la fixation descend à un minimum inappréciable. Pour cette fonction, le calcium et le strontium ne peuvent être remplacés par d'autres éléments: tous leurs composés solubles non toxiques agissent également bien. Selon SCHROEDER [127] les Azotobacters peuvent fixer l'azote seulement si en dehors du sucre, du phosphate bipotassique, du sulfate de magnésie et du carbonate de chaux, ils trouvent dans le milieu Fe, Zn, Cu, Wo, Mo, Si; mais on ne sait pas

si ces éléments ont une action spécifique ou peuvent être remplacés par d'autres. L'effet favorable de l'acide phosphorique sur le développement des Azotobacters dans les cultures et dans le terrain a été plusieurs fois mis en évidence ([115], [121], [128], [129]). Et finalement on a signalé l'action stimulante qu'exercent sur leur activité végétative et fixatrice les minéraux radioactifs ([130]), le soufre colloidal, l'arseniate de plomb ou de soude ([131]), l'aluminium ([132]), le molibdène ([124], [133]).

Quelle est la diffusion et la fréquence des *Azotobacter* dans le terrain? Les recherches qualitatives exécutées jusqu'à présent, en mettant de la terre dans des liquides nutritifs, nous disent, sans beaucoup de prétention d'exactitude, que les Azotobacters ont été trouvés dans toutes ou presque toutes les terres normales de la Russie ([134]), de l'Inde ([135]), de Java ([136]), de l'Utah ([137]), de l'Ombrie ([138]), dans la moitié à peu près des terres danoises ([139]), polonaises ([140]), suisses ([141]), américaines ([142]), japonaises ([143]) et dans un quart des terres de bois américaines ([116]); tandis que leur absence complète au quasi complète aurait été constatée dans les terrains finlandais généralement très acides ([144]), dans les terrains de bois danois ([145]), dans les terrains des Alpes ([146]), dans les cendres volcaniques ([147]), etc.

Quelques évaluations quantitatives par la méthode de Hiltner et Störmer (ensemencement de liquides sélectifs avec des suspensions de terre d'une diluition progressivement croissante) ont montré un contenu de 0 à 200 *Azotobacter* par gramme de terre des forêts suisses ([148]), de 0 à 10.000 dans plusieurs terrains de bois examinés par FEHER ([149]) et dans quelques terres de l'Italie méridionale étudiées par ROSSI ([150]) et par RICCARDO ([151]), 1800 au maximum dans quelques terres françaises ([152]).

Par la méthode de Winogradsky (plaques de silico-gel avec de la mannite et des sels minéraux, ensemencées avec des grains de terre), WINOGRADSKY ([33]) lui-même a obtenu pour les terrains actifs, qui sont les plus riches en fixateurs aérobies, 2000-3000 colonies d'Azotobacters par gramme et jusqu'à 12.000 dans des terrains soumis à des traitements spéciaux. CURIE ([110]) dans des terres des États Unis a compté de 0 à 750 *Azotobacter* par gramme; ARNAUDI et JARACH ([153]) ont obtenu des résultats négatifs dans les terres de la bruyère lombarde.

Une vaste étude du contenu en *Azotobacter* des terres d'Italie a été exécutée par DE' ROSSI ([154]) avec la méthode de Winogradsky qu'il a modifiée (plaques de gélose simple, imprégnées de mannite et de sels minéraux et ensemencées avec des suspensions de terre). L'examen porte sur 189 échantillons prélevés, à la profondeur moyenne de 10-20 cm., dans les mois de mai et juin; 90 d'entr'eux provenaient de 20 provinces différentes de l'Italie septentrionale, 64 de 11 provinces de l'Italie centrale, 35 de 8 provinces de l'Italie méridionale et insulaire. Dans le premier groupe d'échantillons le nombre des *Azotobacter* variait de 0 à 21.400

par gramme de terre avec une moyenne (en chiffre rond) de 2560; dans le deuxième groupe il était de 0 à 7980 avec une moyenne de 1280; dans le troisième de 0 à 6300 avec une moyenne de 870. La moyenne pour toute l'Italie etait de 1815 *Azotobacter* par gramme de terre. Dans 22,8% des échantillons (et respectivement dans 13,3%, 32,8%, 28,6% des échantillons de l'Italie septentrionale, centrale, méridionale et insulaire) les Azotobacters manquaient; dans 9% des échantillons (et respectivement dans 14,4%, 4,6%, 2,8% des échantillons de chaque groupe) le nombre des Azotobacters dépassait 5000 par gramme de terre.

On peut donc conclure que les *Azotobacter* sont très repandus dans le terrain agraire de constitution physico-chimique normale, tout en restant d'un nombre relativement limité. Naturellement on ne doit tenir aucun compte des chiffres récemment annoncés par plusieurs auteurs russes: par exemple, des 155-188 millions d'Azotobacters par gramme trouvés par RICHTER ([155]) dans les terres de Saratow, des 15-54 millions comptés par SCHULGINA ([156]) dans le Tschernosem de Krasnodar, des 4-5 millions et des 20-57 millions respectivement signalés par CHODZEW ([157]) dans les terres de Kazan et par SALENSKY et KUCHARKOWA ([158]) dans les terres de Charkow. Ces chiffres sont basés sur le simple examen microscopique du terrain et sur la supposition que toutes les grosses formes microbiennes arrondies ou ovales devaient être considérées, sans plus, comme des *Azotobacter*. Cette supposition etait d'autant plus étrange que des recherches culturales exécutées parallèlement dans les mêmes terrains démontraient, au contraire, un manque absolu ou une extrème rareté d'Azotobacters. En effet, les formes classées comme Azotobacters par ces auteurs, une fois isolées en milieux de culture se caractérisent comme appartenant à des espèces complètement diffèrentes et dépourvues de tout pouvoir fixateur: le fait a été prouvé par DIANOWA et WOROSCHILOWA ([159]) dans un long mémoire, accompagné de 20 belles photomicrographies. On pourrait observer qu'une telle présentation démonstrative était peut-être superflue étant donné le manque évident de sérieux des observations visées, mais il est bon que cette démonstration ait été donnée en détail et avec une grande richesse de preuves, pour enlever immediatement toute espèce de doute à ce sujet.

V. — LES CLOSTRIDIUMS FIXATEURS DE L'AZOTE.

Nos connaissances sur le *Clostr. pasteurianum* et sur les ferments butyriques analogues qu'on attribue d'habitude à l'espèce collective *Bac. amylobacter*, n'ont pas beaucoup changé au cours des vingt dernières années. Pour l'isolement et la culture de ce groupe microbien, pour l'identification de chaque espèce ou variété, pour l'étude de leurs

caractères physiologiques, nous devons encore nous reporter aux anciennes recherches fondamentales de WINOGRADSKY [160], de BREDEMANN [161], d'OMELIANSKY [162], de PRINGSHEIM [163]. Nous pouvons tout au plus rappeler qu'en dehors du développement symbiotique des *Clostridium* avec les *Azotobacter* dans les plaques de terre moulée et de silice qu'on a déjà mentionnés, WINOGRADSKY [19] a obtenu la production de colonies des fixateurs anaérobies, à l'état de pureté microscopique sur les plaques de silice avec de la mannite ou du glucose tenues dans des conditions d'anaérobiose relative, soit à l'intérieur d'un dessiccateur, en présence de pyrogallate de potasse et avec évacuation partielle de l'air. Il faut dire aussi, que WINOGRADSKY, en essayant dans les mêmes conditions le pouvoir fixateur des Clostridiums a reconnu encore une fois que le rendement relatif est très bas (5 mg. d'azote fixé pour chaque gramme de sucre consommé); et que les recherches de MC COY, HIGBY et FRED [164] sur *Clostr. pasteurianum* et sur d'autres ferments butyriques plus ou moins analogues, ont donné des résultats encore moins probants (0,66 à 3,98 mg. d'azote fixé pour 100 gr. de liquide de Winogradsky avec 2% de glucose).

Nous ajoutons ici, à titre de curiosité, que CUNNINGHAM et JENKINS [165] ayant constaté l'apparition de nombreuses colonies de coccus des types *Microc. candicans* et *Microc. aurantiacus* dans des cultures anaérobies de Clostridiums butyriques sur gélose glucosée dans lesquelles un peu d'air avait pénetré, n'ont pas hésité à déclarer que ces coccus devaient représenter un stade dans le cycle vital du *Bac. amylobacter.*

Tout aussi imparfaites (nous pourrions presque dire négatives) qu'elles l'étaient il y a 20 ou 25 ans, sont nos connaissances actuelles sur la vie des Clostridiums dans le terrain. Dans ces derniers temps on a démontré [45] qu'un développement abondant de *Clostridium* a réellement lieu dans la terre additionnée d'un excès de substance hydrocarbonée, à condition de reduire son aération. « Ce fait établi — dit WINOGRADSKY [19] — il faut avouer que nos connaissances actuelles ne vont pas bien au delà. Quelle est la fréquence du processus dans le sol ? Quelle est la nature du sol par laquelle il est favorisé ou entravé ? Quelles sont les conditions nécessaires à sa marche dans le milieu naturel ? Quelles sont ses relations avec les autres processus microbiens, la fixation aérobie en première ligne ? Quelle est enfin son importance économique ? Toutes ces questions attendent d'être étudiées par des méthodes efficaces, qui ne sont pas celles actuellement en cours dans les laboratoires de microbiologie ».

Il ne suffit pas, en effet, d'avoir reconnu [166] que *Bac. amylobacter* tolère un degré d'acidité supérieur à celui supporté par les *Azotobacter* (pH = 5,7 et encore moindre) pour en conclure sans autre qu'il faut réserver aux Clostridiums la fonction fixatrice dans les terrains trop

acides pour les fixateurs aérobies. TRUFFAUT et BEZSSONOFF [152] ont compté jusqu'à 10.000 Clostridiums par gramme dans des terres qui ne contenaient pas plus de 1800 Azotobacters. DUGGELI [146, 148] a trouvé que les ferments butyriques anaérobies sont très répandus dans les terrains alpins où les Azotobacters font généralement défaut; et dans les terrains suisses de forêt il a respectivement calculé pour les deux groupes de microbes un contenu moyen de 100 à 10.000 et de 0 à 200 par gramme. ROSSI [150] et RICCARDO [151] ont vu dans certains cas s'élever jusqu'à 50.000 et 75.000, exceptionnellement même à 100.000 par gramme, le nombre des Amylobacters existant dans des terres qui contenaient 10.000 Azotobacters au *maximum*. Ensomme, il semble démontré (avec la certitude limitée permise par la très-imparfaite methode de numération par délaiement dont on s'est servi dans toutes ces recherches) que les germes butyriques anaérobies sont d'habitude plus nombreux dans le terrain que les Azotobacters. Eh bien, rien de tout cela ne justifie en quoi que ce soit la conclusion de TRUFFAUT et BEZSSONOFF [152, 167] que les Clostridiums doivent avoir dans le sol un rôle plus important que les Azotobacters pour la fixation de l'azote. Mais il suffit de penser que les chiffres mentionnés regardent le contenu du sol en ferments butyriques, en général, ou en Amylobacters; et alors, quel que soit le jugement qu'on porte sur l'attribution faite par BREDEMANN [161] des Clostridiums fixateurs de l'azote à l'espèce *Bac. amylobacter* (attribution que WINOGRADSKY [168], par contre, hésite à accepter) nous ne devons pas oublier que BREDEMANN lui même affirme que le pouvoir fixateur dans les différentes souches de *Bac. amylobacter* est très variable et manque complètement chez beaucoup d'entre elles. Comment donc peut-on déduire de la simple numération des Clostridiums butyriques du sol un indice de leur activité fixatrice? Et comment ne pas penser qu'après tout nous ne savons nullement si cette numération se rapporte à des cellules végétatives, c'est-à-dire en condition d'activité physiologique normale, où à de simples spores? Nous ne croyons pas qu'il faille attribuer trop d'importance à l'examen microscopique pur; mais on ne peut nier que, par sa méthode certainement très délicate et sensible, WINOGRADSKY [168] n'est jamais parvenu à observer des formes de Clostridium dans le sol.

A l'appui de leur affirmation, TRUFFAUT et BEZSSONOFF rapportent aussi l'expérience suivante. Deux mélanges de 900 gr. d'une solution nutritive glucosée avec 150 gr. de terre, tenus 14 jours, l'un dans un courant d'air et l'autre en courant d'azote, ont respectivement démontré un gain de 16 et de 30 mg. d'azote. Mais, laissant de côté la grave cause d'erreur représentée très probablement par l'addition d'une forte quantité de terre au liquide de culture, nous devons remarquer que dans ce liquide, bien que mis dans des conditions de large aération ou de stricte

anaérobiose, on est bien loin de reproduire les conditions naturelles de vie des microbes aérobies et anaérobies du sol; les résultats obtenus ne nous disent donc rien concernant l'activité réelle dans le sol des deux groupes de microbes fixateurs.

VI. — Les microbes des tubercules des légumineuses.

On a exécuté ces derniers temps de nombreuses recherches hystologiques sur les tubercules des racines des légumineuses. Parmi celles-ci, il faut mentionner spécialement celles de Wendel [169], de Spratt [170], de Brenchley et Thornton [171], de Milovidov [172], de Dangerad [173], de Mc Coy [174], concernant le mécanisme d'infection des jeunes racines, les modifications apportées par l'infection dans les cellules de la racine, le développement et la différenciation des tubercules, leurs différentes structures, etc. Il s'agit d'études intéressantes sous le point de vue de la botanique, sur lesquelles il n'y a pas lieu de s'arrêter ici. Nous devons par contre rappeler, toujours à propos des tubercules, que d'après Mueller et Stapp [2] les bactéroides qui s'y trouvent seraient des formes tératologiques, et que Bazarewsky [175] aussi les considère comme des formes d'involution incapables de se multiplier et probablement de fixer l'azote. Pfeiffer [176], au contraire, rejette l'opinion que les bactéroides soient le résultat d'un processus dégénératif; il adopte l'avis géneral qui consiste à y voir un stade normal du cycle d'évolution du *Bac. radicicola.*

Il n'y a pas beaucoup à dire sur les moyens d'isolement et de culture du *Bac. radicicola.* Parmi les nouveaux milieux nutritifs conseillées, nous citerons la gélose à l'extrait de levure de Wright [177]. Un certain poids de levure est délayé dans dix fois son poids d'eau; puis on porte 1 ou 2 heures à l'étuve à 100°, et après 24 heures de repos, on décante le liquide brun clarifié [178]; à 100 cm. d'extrait ainsi préparé, on ajoute 900 cm. d'eau, 15 gr. de gélose, 10 gr. de mannite, 1 gr. de carbonate de chaux, 0,2 gr. de chlorure de sodium, 0,5 gr. de phosphate bipotassique, 0,2 gr. de sulfate de magnésie, 0,1 gr. de sulfate de chaux; on fait bouillir et l'on stérilise selon la technique ordinaire. Allison [179] s'est rendu compte, en 1927, que l'addition d'extraits de légumineuses (et même d'autres plantes) aux milieux nutritifs favorise le développement des germes tuberculigénes. Wilson [180], pour évaluer le nombre de ces microbes dans le terrain, s'est servi de la vieille méthode des dilutions progressives du terrain même, dont il employa des doses déterminées comme matériel pour infecter des légumineuses ensemencées en terrain sterile; il recherchait la présence éventuelle de tubercules dans les petites plantes 15 jours après l'ensemencement. Il est permis de douter de l'exactitude des chiffres obtenus par ce procédé: 0 à 100.000 germes tuberculigènes pour chaque gramme

de terre. Il est douteux, du reste, que la méthode directe d'isolement et de numération des *Bac. radicicola* du terrain, donne de plus sûrs résultats [181] et que, par exemple, les chiffres très élevés cités à ce propos par GREIG-SMITH [182] correspondent à la réalité.

Bien que la chose puisse sembler étrange, il y a encore des expérimentateurs qui en isolant les germes tuberculigènes ne tienennent pas compte des causes d'erreur depuis longtemps signalées [183], qu'on peut résumer de la manière suivante: 1) dans les cultures préparées en partant des tubercules radiculaires, des colonies tout à fait différentes de celles du *Bac. radicicola* et appartenant à des germes de souillure provenant de la surface, voir même de l'intérieur des tubercules, peuvent très facilement se développer; 2) d'autres germes de souillure peuvent donner des colonies semblables à celles du *Bac. radicicola*, et diffèrent de celui-ci seulement par l'incapacité de reproduire les tubercules dans les légumineuses; 3) les colonies de *Bac. radicicola* qui se développent très lentement donnent seules une garantie de pureté, du fait qu'elles proviennent vraisemblablement d'une ou de très peu de cellules microbiénnes. Par contre, les colonies qui se développent rapidement ont leur origine dans un amas de germes ou dans un fragment de tissu bacteroide non suffisamment désagrégé et contenant éventuellement des microbes étrangers. Or, ces colonies, même si, à première vue, elles présentent des caractères de pureté, sont exposées souvent au cours des passages successifs à de notables variations des caractères macroscopiques et microscopiques,dues évidemment au développement progressif et croissant des germes contaminants qui par leur plus grande activité reproductive couvrent et finissent par supplanter complètement le *Bac. radicicola*.

Il est hors de doute que nous devons comprendre parmi ces germes contaminants le *Bac. radicicola* (*forma Carmichaeliana*) que MILOVIDOV [184] a trouvé dans les tubercules de *Carmichaelia australis* (coccus Gram positif, qui pousse bien en gélose de viande peptonisée, donnant des colonies colorées en rose-brun, et dont on n'a même pas essayé le pouvoir infectant vis à vis de la légumineuse dont il a été isolé), ainsi que le *Rhizobium meliloti* de HOFER et BALDWIN [185] (qui pousse bien dans du bouillon de viande peptonisé et peut liquéfier la gélatine) et les autres espèces de *Rhizobium* qu'ALMON et BALDWIN [186] auraient isolées des tubercules, ou auraient vu paraître spontanément dans les cultures de laboratoire. Ces espèces ont des caractères tout-à-fait différents de ceux du *Bac. radicicola*; elles donnent des colonies colorées en jaune, orange, rouge-brun, etc., et se sont démontrées incapables de produire des tubercules dans les expériences d'inoculation !

Toujours à propos de contaminations, on doit rappeler ici les observations de certains auteurs l'existence normale dans les tubercules

radiculaires des légumineuses d'une symbiose de *Bac. radicicola* avec *Bact. radiobacter* [187], ou avec *Bac. mycoides* [188], ou avec *Bact. radiobacter* et une forme proche du *Bac. tumefaciens* [189].

Enfin, il est bien possible que l'examen de cultures impures ait eu aussi son influence sur l'activité des bâtisseurs modernes de cycles de développement, à qui le *Bac. radicicola* n'a pas échappé. BEWLEY et HUTCHINSON [190] ont reconnu dans le développement cultural de ce microbe l'apparition de formes en coccus immobiles, de formes bacillaires mobiles et de formes vacuolisées avec inclusions de chromatine qui, en s'arrondissant, reproduiraient les coccus. Avec cela, à part le fait d'appeler coccus les granules chromatiques que l'ont peut observer dans certaines conditions culturales, on ne s'eloigne pas beaucoup des connaissances classiques sur la morphologie du *Bac. radicicola.* THORNTON et GANGULEE [191] de l'examen microscopique de cultures dans de la terre concluent que le microbe tuberculigène passe à travers un cycle de formes comprenant de courtes bactéries qu'on peut colorer uniformément à l'érythrosine phéniquée, de longues bactéries à bandes transversales de matière chromatique, des coccus mobiles et pourvus de cils, et, de nouveau, de courtes bactéries. Les formes irrégulières ramifiées (bacteroides) que l'on trouve toujours à l'intérieur des tubercules ne feraient pas partie, d'après ces auteurs, du cycle normal d'évolution du microrganisme. Beaucoup plus compliqué, et évidemment inspiré de celui que d'autres auteurs ont établi pour les Azotobacters, est le cycle imaginé par KAS [192]. Les cellules vegétatives de 4 à 5 μ sur 1 μ, après 2 ou 3 jours de développement en gélose ou en gélatine, subissent un processus de conjugaison (union de 2 cellules ou plus, avec échange protoplasmique); ensuite il y a formation d'organes reproducteurs, savoir de gonides, corps regénératifs, éxospores, arthospores, microcystes. Aussi bien les cellules végétatives, que les organes reproducteurs peuvent se fondre en un symplasme qui réfracte fortement la lumière et qui est difficile à colorer: de ce symplasme se forment à nouveau les différents éléments cellulaires.

SCHÖNBERG [193], lui aussi, est d'avis de la formation du symplasme. Un cycle très semblable à celui de KAS a été finalement rapporté par GIBSON [194], également basé sur l'interprétation plus ou moins arbitraire de préparations microscopiques [195].

Mais d'autres questions bien plus intéressantes relatives à la connaissance des microbes des tubercules des légumineuses ont attiré, ces derniers temps, l'attention des chercheurs. L'une d'entre elles a une importance tout-à-fait fondamentale, aussi bien du point de vue purement scientifique, que pour les applications pratiques qu'on peut en tirer. Il s'agit de l'unité ou de la pluralité d'espèce des microbes tuberculigènes. On sait que BEIJERINCK [196], en indiquant dans l'espèce *Bac. radicicola*

le germe producteur des tubercules, avait signalé deux varietés de ce microbe. La première est particulière aux tubercules de *Faba, Vicia, Pisum, Trifolium*, etc., avec des bacteroides fourchus, piriformes, ou globulaires, des bacilles plutôt courts dans les cultures, des colonies à aspect hyalin sur gélatine de légumineuses, développement limité ou négatif sur gélatine de viande. La seconde variété, qui dérive des tubercules de *Phaseolus, Lupinus, Robinia*, a des bacteroides à batônnets, rarement fourchus, des bacilles plus longs, des colonies plus blanches et opaques sur gélatine de légumineuses, développement relativement facile aussi sur gélatine de viande. HILTNER et STÖRMER (197) ont admis l'existence de deux espèces, correspondant seulement en partie aux deux variétés de BEIJERINCK; en adoptant le genre *Rhizobium* précédemment établi par FRANCK (198) il ont distingué un *Rhiz. radicicola* qui comprendrait les microbes que l'on peut isoler de la plupart des légumineuses (on devrait attribuer à cette espèce la description donnée par DE' ROSSI (183) pour les bactéries isolés de *Vicia Faba, Vicia villosa, Pisum sativum, Trifolium pratense, Trifolium repens, Hedysarum coronarium, Medicago falcata, Medicago denticulata, Phaseolus vulgaris*) et un *Rhiz. Beijerincki*, auquel appartiendraient les microbes dérivés de *Lupinus, Ornithopus, Soja* et quelques autres légumineuses, que l'on peut différencier de la première espèce surtout pour le peu d'aptitude à croître sur les terrains nutritifs à base de gélatine, et par sa facilité de développement sur ceux à base de gélose. D'autres auteurs, au contraire, n'ont pas accepté cette distinction; ils pensent que tous les microbes des nodules des légumineuses appartiennent à une espèce unique, dans laquelle on devrait simplement distinguer un certain nombre de variétés physiologiques, en rapport avec leur adaptation aux différentes légumineuses et, par suite, avec des différences d'aptitude à produire des tubercules dans les légumineuses elles-mêmes (199).

Ceci était l'état des choses il y a 10 ou 12 ans. Plusieurs auteurs ont confirmé ensuite le dualisme d'espèce, en distinguant une espèce péritriche et une espèce monotriche. BURRIL et HANSEN (200), les premiers, auraient reconnu que les bacilles dérivant de légumineuses des genres *Vigna, Glycine, Acacia, Arachys, Baptisia, Genista, Cassia, Amphycarpa, Lespedeza, Desmodium, Mucuna*, sont monotriches. LÖHNIS et HANSEN (187) ont décrit une espèce correspondant au *Bac. radicola* de BEIJERINCK, particulière aux légumineuses européennes (*Trifolium, Melilotus, Medicago, Vicia, Pisum, Lupinus, Amorpha, Strophostyles*, etc.) ayant un système péritriche de cils, se développant abondamment sur la gélose à extrait de terre mannitée et déterminant une coagulation floconneuse du lait avec formation d'une zone claire de sérum à la surface. Les mêmes auteurs ont décrit aussi une espèce, peut-être identique avec *Pseudo-*

monas japonica précédemment décrite par KIRCHNER [201] comme étant l'agent tubercoligène du soja, et particulière aux légumineuses américaines et asiatiques (*Soja, Vigna, Lespedeza, Acacia, Genista, Desmodium, Cassia*, etc.), monotriche, avec un développement lent sur gélose, et sans action sur le lait. La distinction des deux espèces, au moins pour ce qui concerne la disposition des cils, a été confirmée par les recherches de SHUNK [202] d'après lesquelles les microbes de *Vicia, Trifolium, Medicago, Pisum, Melilotus, Robinia, Phaseolus, Lathyrus*, sont péritriches, tandis que les microbes de *Albizia, Cassia, Baptisia, Cracca, Meibomia, Vigna, Soja, Arachys, Stylosanthes, Clitoria, Pueraria, Dolichus, Lespedeza, Stizolobium* sont monotriches. Par contre, dans le bacille du soja, WILSON [203] aurait observé les cils en formation péritriche.

BALDWIN et FRED [204] avaient cru pouvoir établir un autre caractère différentiel entre l'espèce péritriche et l'espèce monotriche. La première cultivée sur gélose avec adjonction de sucres donnerait lieu à une production d'acides, tandis que la seconde produirait une diminution de la concentration des H-ions dans les milieux de culture. Mais SCHÖNBERG [205], et ensuite WALKER et BROWN [206], ont observé que les modifications de la réaction des milieux varient beaucoup avec les différentes souches bactériennes dérivant d'une même plante et ne présentent aucune correspondance constante avec les autres caractères morphologiques et culturaux; on ne peut donc se baser sur ce point pour l'identification et la classification des microbes tuberculigènes.

La distinction des deux espèces de LÖHNIS et HANSEN a été acceptée par BERGEY [207] et par SCHÖNBERG [205]. Mais pour ce qui est de BERGEY, on ne comprend pas pourquoi il décrit comme *Rhiz. leguminosarum* l'espèce dérivant des tubercules de *Vicia, Pisum, Lathyrus*, etc., pour laquelle, en déhors de son étrange affirmation qu'elle peut quelquefois liquéfier la gélatine, il rapporte les caractères de l'espèce pèritriche indiquée par les autres auteurs comme *Rhiz.* (*Bac.*) *radicicola*, et il appelle par contre *Rhiz. radicicola* le microbe propre de *Lupinus, Soja, Ornithopus*, en le décrivant comme un bacille monotriche, avec des bactéroides renflés à une extremité ou au centre.

MULLER et STAPP [2] auraient distingué 11 espèces de bactéries des tubercules radiculaires; mais il est douteux qu'une telle subdivision trouve une base suffisante dans les caractères différentiels morphologiques et physiologiques que ces auteurs ont décrits. DANGEARD [173] se basant surtout sur l'étude microscopique des tubercules voudrait distinguer 10 espèces bactériennes: *Rhiz. polymorphum, Rhiz. trifolii, Rhiz. fabae, Rhiz. melitoti, Rhiz. loti, Rhiz. simplex, Rhiz. torulosum, Rhiz. phaseoli, Rhiz. minimum, Rhiz. sojae*. A leur tour BALDWIN, FRED et EKHARDT [208,209] distinguent: *Rhiz. leguminosarum, Rhiz. trifolii, Rhiz. phaseoli, Rhiz. me-*

litoti, péritriches, *Rhiz. japonicum,* monotriche, *Rhiz. lupini* dont ils n'indiquent pas la distribution des cils et qui serait capable de croître sur gélatine de viande peptonisée en la liquéfiant. Nous croyons inutile de rapporter les autres caractères attribués à ces espèces: il s'agit essentiellement de différences d'aspect des bactéroides dans les tubercules et de différences dans l'action des microbes sur les milieux sucrés. Nous venons dire que ce dernier caractère est dépourvu de toute valeur différentielle.

Lehmann et Neumann dans l'édition la plus récente de leur traité (210) conservent une seule espèce de *Bac. radicicola,* tout en admettant la possibilité que les microbes des tubercules des légumineuses appartiennent à plusieurs espèces ou variétés (*).

Si le problème de l'unité, duplicité, ou pluralité des espèces des germes tuberculigènes est encore à résoudre et est assez confus, l'autre question de la différenciation et du groupement des germes sur la base de leurs caractères physiologiques n'est pas définie non plus.

Comme résultat de très nombreux essais d'inoculation on croyait desormais établi, il y a quelques années, que les cultures isolables des tubercules des légumineuses pouvaient être distribuées en un certain nombre de groupes bien distincts; chacun de ceux-ci comprenait des légumineuses donnant un résultat positif (apparition de tubercules) dans les expériences d'inoculation avec les cultures dérivées de toutes les espèces du même groupe, et un résultat négatif avec les cultures dérivées de plantes des autres groupes (211, 212, 213, 214). Walker (215) en résumant les résultat de ces expériences d'inoculation croisée a distingué les bactéries tuberculigènes en 18 groupes, comprenant 42 genres et 89 espèces de légumineuses. Une telle subdivision semblait aussi avoir une confirmation dans les essais d'agglutination dont les résultats présentaient géneralement un parallélisme tres remarquable avec ceux des essais d'inoculation (216, 217, 218, 219, 220, 221).

Mais cette correspondance de résultats est mise en doute par des recherches plus récentes. Stevens (222) a observé que les cultures d'un groupe donné d'inoculation croisée ne présentent pas toutes et pas toujours une correspondante agglutination croisée; par contre, plusieurs souches distinctes au point de vue sérologique peuvent produire des nodules dans la même légumineuse: 55 cultures qui par leur manière de se comporter à l'égard des légumineuses appartenaient à 7 groupes, furent différenciées par Stevens en 18 groupes sérologiques. Aso et Okhawara (223) par des

(*) Dans la suite de ce Rapport les germes tuberculigènes sont indiqués par le vieux nom général de *Bac. radicicola*; mais quand on rapportera les recherches des auteurs qui admettent l'existence de différentes espèces, on devra naturellement employer aussi les autres dénominations.

épreuves de précipitation, d'agglutination et de fixation du complément, ont distingué en trois groupes les cultures isolées de plantes du genre *Vicia,* qui appartiennent au même groupe d'inoculation. ISRAILSKY (224) a déduit de ses essais d'agglutination et de fixation du complément, que l'on peut isoler de la même espèce de légumineuses differentes races bactériennes. WRIGHT (225) a différencié 6 groupes sérologiques pour 156 souches de bactéries du soja. BIALOSUKNIA et KLOTT (226) non seulement auraient observé que des légumineuses de la même espéce peuvent donner des cultures avec des propriétés d'agglutination différentes, mais que des nodules de la même plante peuvent aussi contenir des bactéries ayant des affinités sérologiques différentes. Les recherches de JIMBO (227) aboutissent à peu près à la même conclusion.

La différenciation parmi les cultures isolées d'un même groupe de légumineuses ou d'une même légumineuse, n'a pas seulement rapport aux caractères sérologiques. Celle-ci, par exemple, regarde aussi l'aptitude à infecter les légumineuses. HELZ, BALDWIN et FRED (228) ont obtenu ainsi avec 17 cultures du groupe *Vicia-Pisum* des résultats très variés dans les expériences d'inoculation sur *Pisum sativum, Vicia villosa, Vicia Faba, Lathyrus odoratus, Lens esculenta.* Sur *Vicia Faba* sa souche était active, tandis que celle dérivée de *Pisum* avait une action limitée. Les souches provenant de *Vicia Faba* et de *Pisum* prirent bien aussi sur *Vicia villosa* et *Lens esculenta*; sur le *Lathyrus,* sa propre culture seule avait de l'efficacité. Une souche aurait produit des tubercules sur toutes les plantes, mais sans donner lieu à la fixation d'azote.

D'après RICHMOND (229) les cultures dérivant de *Vigna sinensis* donnaient un résultat positif à l'inoculation de *Phaseolus angularis, aconitifolius, aureus, calcearatus, radiatus,* de *Vigna sesquipedalis,* de *Canavalia, Dolichos, Crotalaria,* etc. La forme monotriche du germe tuberculigène (le *Rhiz. japonicum* des auteurs américains) serait donc caractéristique et active pour toutes les légumineuses asiatiques. De leur côté LEONARD (230) et ensuite HANSEN et TANNER (231) auraient reconnu que les cultures dérivant de *Vigna* et de *Soja* ont une activité réciproque à l'inoculation, bien qu'à un degré parfois inégal. Mais SEARS et CARROL (232), tout en confirmant que toutes les cultures isolées du *Soja* sont actives sur *Vigna,* ont vu que quelques unes seulement de celles isolées de *Vigna* sont actives sur *Soja.* Et si les recherches de BALDWIN et HOFER (233) sont exactes, parmi les souches de *Rhiz. japonicum,* il y en aurait de capables de produire toujours des tubercules dans les plantes de *Soja* cultivées dans du sable, alors que d'autres ne seraient actives que lorsque les plantes se trouvent dans des conditions particulièrement convenables pour la photosynthèse, et n'auraient aucune action sur les plantes ayant une fonction photosynthétique moins active, ou fertilisées avec des ni-

trates. Quelques souches produiraient toujours des tubercules aussi bien sur *Soja* que sur *Vigna*; d'autres toujours sur *Soja* et quelquefois sur *Vigna*; d'autres toujours sur *Soja* et jamais sur *Vigna*. Des résultats analogues auraient été obtenus avec différentes souches isolées de *Vigna* et essayées sur de différentes espèces de *Phaseolus*.

A ces constatations peut servir de pendant le fait assez souvent observé dans la pratique de la culture ou dans les épreuves expérimentales, que des plantes de *Soja* croissant à proximité de plantes de *Vigna* riches en tubercules, peuvent parfois en être dépourvues ([234], [235]). De deux variétés différentes de *Soja* cultivées en même temps, on a vu aussi parfois que l'une avait des tubercules tandis que l'autre en manquait ([236], [237]); Fred et Bryan ([238]), cependant, sur la base de recherches expérimentales, affirment que les bactéries provenant de chaque variété de *Soja* sont actives pour toutes les autres, et que les conclusions différentes déduites de la pratique agricole doivent être mises au compte de facteurs étrangers à l'activité des microbes. D'une façon analogue, les recherches de Perkins ([239]) prouveraient que la richesse très différente en tubercules que l'on observe dans les différentes variétés de *Soja* inoculées avec le même microbe ne dépend pas d'une plus ou moins grande adaptation du microbe aux différentes variétés de la légumineuse, mais de l'existence dans ces variétés de propriétés physiologiques qui les rendent plus ou moins résistentes à l'infection.

On affirme aussi que, même parmi les souches que l'on peut isoler d'une même espèce de légumineuses, des différences peuvent exister aussi bien entre leurs caractères culturaux qu'entre leurs affinités sérologiques et leur activité azoto-fixatrice. Wright ([240]) de l'étude de nombreuses cultures isolées de *Soja max.*, a été porté à admettre l'existence de deux biotypes du microrganisme correspondant. Il s'agit d'un bacille monotriche à bouts arrondis, de 2 à 3 sur 0,4 à 0,7 μ. Le type *A* serait en outre caractérisé par le développement abondant sur gélose à l'eau de levure avec 1% de mannite, où des colonies circulaires se forment, épaisses, muqueuses, opaques, d'un blanc de perle, par le manque de développement en bouillon de viande et sur pomme de terre, et par une abondante production de gomme; ce type comprend, au moins, deux groupes sérologiques distincts. Le type *B* a un développement plus limité sur la gélose à l'eau de levure avec mannite, où il forme des colonies minces, humides, diffuses, transparentes ou translucides, montre un très léger trouble du bouillon de viande (après 10 ou 15 jours) et un développement très limité sur pomme de terre (après 3 ou 4 semaines) avec formation de bactéroides; il produit peu de mucus et donne un sérum agglutinant de titre très élevé mais inactif pour toutes les souches du type *A*. Des expériences d'inoculation furent repétées pendant 3 ans sur 3 variétés différentes de *Soja*, avec 6 souches appartenant aux deux types; les plantes inoculées avec

le biotype *A* auraient atteint le poids moyen de gr. 17,18 (substance sèche) fixant une moyenne de gr. 0,301 d'azote, tandis que chaque plante inoculée avec le biotype *B* pesait en moyenne gr. 13,70 et avait fixé 0,126 gr. d'azote.

De l'examen de 13 cultures dérivantes du groupe *Medicago-Melilotus*, STEVENS [241] aurait obtenu des résultats complétement analogues, savoir l'existence d'un premier type caractérisé par un développement plus abondant sur les terrains nutritifs et par la formation de colonies relévés, opaques, d'un blanc de perle, et d'un second type avec développement restreint et des colonies minces et blanchâtres. Des différences sérologiques correspondaient généralement à ces différences de culture. Des plantes cultivées dans du sable et inoculées avec des cultures du premier type se seraient enrichies en azote dans une proportion au moins double de celle fixée par d'autres plantes inoculées avec des cultures du seconde type.

Tandis que WHITING, FRED, HELZ [242] ont observé que les tubercules de *Dalea alupecuroides* contiennent un bacille péritriche qui, à l'essai d'inoculation croisée, s'est révélé différent de ceux qui appartiennent à onze autres groupes de légumineuses, SEARS et CLARK [243] tout en confirmant que les cultures isolées des légumineuses les plus communes, n'ont pas de pouvoir d'infection pour *Dalea alupecuroides*, ont reconnu que les cultures dérivant de cette dernière sont actives sur *Phaseolus vulgaris*. Les nodules seraient également abondants aussi bien dans les plantes de haricot, inoculées avec des cultures provenant du haricot même, que dans celles inoculées avec des cultures provenant de *Dalea*. Dans le premier cas cependant, la quantité d'azote fixée serait de 194-216 mg. par plante, dans le second seulement de 89-90 mg. Cette évidente dissociation entre le pouvoir d'infection et l'activité fixatrice a été confirmée par les recherches ultérieures de HANSEN et TANNER [231] concernant également l'inoculation de plantes de haricot avec des bactéries isolés de *Dalea*.

On a reconnu déjà depuis longtemps [244, 245, 246] que l'apparition de tubercules dans les légumineuses n'est pas suivie nécessairement de fixation d'azote. De nouvelles observations à propos de l'existence de nodules radiculaires inactifs et par là incapables de fournir de l'azote aux plantes qui les portent, et qui présentent les symptômes de carence d'azote si celui-ci ne leur est pas fourni d'une autre manière, ont été rapportées par HELZ, BALDWIN et FRED [228], par M. LÖHNIS [247], par DUNHAM et BALDWIN [248]. Aucune différence de structure n'existe, d'aprés LÖHNIS, entre les tubercules actifs et les tubercules inactifs de *Pisum* et de *Trifolium*. En quelque cas, l'inactivité semble être en rapport avec la présence persistante des microbes de forme bacillaire dans les nodules;

mais en d'autres cas (spécialement dans les nodules de trèfle) les bacteroides sont également fréquents aussi bien dans les nodules actifs que dans les nodules inactifs. D'après DUNHAM et BALDWIN une même plante peut avoir à la fois des tubercules dûs à une souche microbienne active, capable de fixer l'azote, et d'autres tubercules produits par une souche inactive, c'est-à-dire capable d'infecter mais inapte à assimiler l'azote élémentaire en quantité suffisante pour la plante cultivée dans un milieu pauvre en azote. Les deux souches cependant n'ont jamais été trouvées dans le même tubercule.

Pour ce qui est de la vieille affirmation de HILTNER [249], que l'activité des cultures de *Bac. radicicola* peut être exaltée par des passages repétés à travers les plantes, elle a été confirmée récemment par WUNSCHIK [250], mais non par STAPP [251].

« Le mécanisme de la fixation de l'azote dans la symbiose du *Bac. radicicola* avec les légumineuses est encore très obscur ». Voilà ce que j'affirmais il y a dix ans [252] et ce que je dois répéter aujourd'hui. Après mes recherches [253] d'où il résultait sans possibilité d'équivoque (*) que les cultures pures de *Bac. radicicola* sont incapables d'assimiler de l'azote élémentaire, les prétendues démonstrations du pouvoir fixateur de ces même cultures n'ont pas fait défaut [254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262]. Il n'y a pas lieu de discuter ici si ces résultats sont attribuables à l'emploi de cultures impures, à l'imperfection des méthodes d'analyse, ou à d'autres erreurs de technique dont nous nous sommes déjà occupés au § II. Il est certain que, tout récemment, les nombreuses recherches de BARTHEL [263], STIEHR [264], SKINNER [265], HOPKINS [266], ALLISON [267], BURK [268], LÖHNIS [269], POHLMANN [270], WILSON HOPKINS et FRED [271], exécutées avec une rigoureuse technique, concordent à éliminer l'hypothèse que dans les cultures du *Bac. radicicola,* on puisse constater une augmentation d'azote supérieure aux limites des erreurs normales d'expérimentation.

Par contre, dans les plantes de trèfle et de luzerne cultivées sur gélose ensemencée avec *Bac. radicicola*, WILSON HOPKINS et FRED [272] ont constaté de petits gains en azote (2 à 10 mg. pour 10 plantes).

Il y a encore un point qui n'est pas très clair: quel est le mécanisme d'infection des légumineuses de la part du *Bac. radicicola*? Quelles sont

---

(*) Qu'il me soit permis de relever l'etrange affirmation de LÖHNIS [269] que « Gino de' Rossi arrives at very irregular results...; no conclusion can be drawn out of a loss of 63,4 mg. and an increase of 21 mg. in inoculated cultures ». Tout cela est absolument fantastique, mais on peut l'expliquer quand l'A. dit que « the paper was not available ». Il s'agit d'une citation de seconde main, complètement erronée. HOPKINS [266] est aussi inexact, soit en citant les données tirées de mes expériences, soit en m'attribuant la conclusion « that the nodule bacteria fix only insignificantly small amounts of nitrogen ». Dans mon travail j'affirme « que dans les cultures certainement pures et sûrement identifiées du microbe producteur des tubercules des légumineuses on ne peut remarquer aucune fixation de l'azote élémentaire atmosphérique ».

les causes et le mode de pénétration du microrganisme dans les racines? Selon les dernières recherches de Mc Coy [273], l'infection ne consiste pas dans un simple envahissement des poils radiculaires normaux, ou mécaniquement altérés, ou cassés. Les bactéries, qui attaquent invariablement l'extrémité des poils, produisent une sécrétion capable d'en modifier la paroi, comme il est démontré par la frisure anormale ou la courbure des poils. Cette sécrétion peut être séparée par filtration des cellules microbiennes et n'est pas spécifique pour les plantes du groupe d'inoculation, à qui les bactéries appartiennent; en effet, la présence dans le terrain de bactéries tuberculigènes, même appartenant à des groupes étrangers d'inoculation, provoque dans les racines des légumineuses une augmentation assez importante du nombre des poils courbés ou frisés. On doit remarquer cependant, que dans leurs cultures les bactéries ne paraissent attaquer ni la cellulose, ni la pectine, ni le pectate de calcium; la frisure des poils radiculaires ne paraît donc pas être le résultat de l'action microbienne sur ces parties constituantes. Baldwin, Fred, Hastings [274] ont cru pouvoir établir une corrélation entre l'affinité sérologique des composés protéiques des graines des légumineuses et la manière de se comporter des plantes dans les expériences d'inoculation croisée. Ils ont affirmé: 1) que toutes les légumineuses appartenant au même groupe d'inoculation croisée montrent des analogies étroites dans les protéines de leurs graines; 2) que, dans la plupart des cas, les plantes dont les graines possèdent des composés protéiques analogues peuvent subir l'inoculation croisée. Mais Hansen et Tanner [281] ont prouvé que ces conclusions ont beaucoup d'exceptions et que, par conséquent, il est impossible d'interpréter le mécanisme de l'inoculation par une corrélation entre la constitution protéique des plantes et celle des bactéries.

Certaines expériences au cours desquelles l'apparition des nodules dans les jeunes plantes de luzerne était rendue plus précoce par la présence de plantes déjà bien développées, ont mené Thornton [275] à admettre que les légumineuses sécrètent quelque substance qui favorise la nodulation.

De nouvelles recherches se sont ajoutées a celles déjà nombreuses, relatives à l'action des différents agents physiques et chimiques sur *Bac. radicicola* dans les cultures, et surtout dans son milieu naturel (terrain et tubercules). Alors que dans le passé on pensait que les germes tuberculigènes étaient très peu résistants à l'action de la dessication et de la lumière [276, 277, 278], l'expérience plus récente semble démontrer le contraire, et précisément qu'ils peuvent résister très longtemps. Tout en acceptant avec un certain scepticisme les faits rapportés par Edwards [279], c'est a dire que des cultures de *Bac. radicicola* en gélose à la décoction de cendres de bois maltosée, gardées en des récipients fermés, après 10

ou 16 ans étaient encore vivantes et très actives pour des expériences d'inoculation, nous ne pouvons pas douter, après les observations de TEMPLE (280), de FELLERS (281), de RICHMOND (282), d'ALICANTE (283), de LOCHHEAD (284), de PORGES (285), que les germes tuberculigènes restent vivants de 2 à 6 mois sur les graines. Nous devrions aussi admettre, d'après RUSSELL et MORRISON (286), ALBRECHT (287), VANDECAVEYE (288), ALBRECHT et TURK (289), que les mêmes germes sont capables de résister de 11 mois à 6 ans dans un terrain sec et de 7 à 17 ans dans un terrain à humidité normale.

L'influence de la réaction du sol et de son contenu en chaux sur les bactéries tuberculigènes et sur la production des tubercules a été démontrée de façon toujours plus évidente. Les notions deja acquises, au sujet de l'action nuisible de l'acidité sur le *Bac. radicicola* (290, 291), ont été ainsi confirmées. BRYAN (292) en cultivant du soja et d'autres légumineuses dans des solutions nutritives et dans du sable, a vu que la réaction plus favorable pour le développement des plantes et pour l'apparition des tubercules correspondait à pH = 6,5; les limites pour la végétation étaient pH = 3,9 et 10, pour la nodulation pH = 4,6 et 8,0. Pour le développement des microbes tuberculigènes de différentes légumineuses dans le terrain, SNIESZKO (293) a reconnu comme optimum pH = 5,5 à 6,3, et comme limites pH = 4,5 et 7,0. VIRTANEN (294) a confirmé que les bactéries sont plus sensibles que les plantes à l'acidité. Les légumineuses, en effet, cultivées dans des terres riches en azote, et partant indipéndantes des bactéries tuberculigènes, ne sont pas endommagées dans leur développement par un degré relativement élevé d'acidité; par contre dans les terrains pauvres en azote la courbe du développement des plantes par rapport au pH, correspond à celle du développement du *Bac. radicicola*. KARRAKER (295), en cultivant des plantes de luzerne avec une partie des racines en terrain acide, et l'autre partie dans le même terrain additionné de chaux, a trouvé dans la tuberculisation des deux moitiés du système radiculaire une différence tout à fait semblable à celle observée dans les plantes entièrement cultivées en terrain respectivement acide et non acide. Ces résultats et ceux, tout à fait analogues, obtenus par ALBRECHT et DAVIS (296) et par DOOLAS (297) avec d'autres légumineuses, servent à démontrer que le manque des tubercules dans les plantes cultivées en terrains acides dépend moins de l'action générale de l'acidité sur les légumineuses, que de l'action sur les bactéries.

On doit aussi observer que l'action utile de la chaux n'est pas toujours due à son effet neutralisant de l'acidité, mais parfois peut dépendre du fait qu'elle apporte aux plantes un élément nécessaire, tel que le calcium, qui éventuellement peut n'être contenu dans le terrain qu'en proportions extrêmement limitées. En effet, de petites quantités de cet

élément fournies à des terrains acides ou non acides, sous forme de sels qui, comme l'acetate, n'en modifient pas sensiblement la réaction, peuvent favoriser beaucoup l'apparition des tubercules [296, 298].

A propos de l'action que les composés azotés ajoutés aux milieux nutritifs exercent sur le *Bac. radicicola,* on a confirmé à plusieurs reprises que les nitrates sont bien utilisés comme source d'azote et sont partiellement reduits en nitrites [299, 300, 301]. Les germes tuberculigènes utilisent aussi une partie de l'azote du groupe amminique de plusieurs ammino-acides, et en libérent de l'ammoniaque, mais avec une activité différente pour les différentes variétés ou espèces microbiennes [301]. Par contre, on reste encore incertains à propos de l'effet des nitrates ajoutés au terrain sur l'activité fixatrice des légumineuses. FRED, WHITING et HASTINGS [261], LIPMAN et BLAIR [302] ont apporté de nouvelles preuves de l'action favorable des nitrates, WILSON [303], HILLS [257], STROWD [304] de leur action nuisible sur la production des tubercules. ALBRECHT [305] a reconnu que des quantités remarquables d'azote atmosphérique peuvent être fixées par les légumineuses dans des terrains contenant une certaine proportion d'azote assimilable et aussi d'azote nitrique. WEBER [306] confirme que la fourniture d'une quantité limitée d'engrais azoté aux légumineuses n'exerce aucune influence sur la pénétration des microbes dans les racines et sur le commencement du processus d'azoto-fixation. Mais dans le développement ultérieur des légumineuses, quand la période de carence d'azote est passée, les plantes qui n'ont pas recu d'engrais azoté présenteraient un développement supérieur à celles qui en ont reçu.

Des expériences de laboratoire qui ont besoin d'être confirmées auraient induit PERKINS [307] à croire que les éléments nutritifs essentiels pour le développement des légumineuses, calcium, phosphore, potassium, n'ont pas d'influence directe sur l'infection des plantes et sur le développement des tubercules. BRENCHLEY et THORNTON [308] au contraire, pensent qu'aux éléments généralement considérés nécessaires ou du moins utiles pour le développement et la fonction normale des nodules radiculaires, on doive ajouter aussi le bore. Si cet élément fait complétement défaut les tubercules seraient peu nombreux, de structure anormale, les bactéroides ne se formeraient pas et la fixation d'azote serait considérablement réduite.

Il y a presque 25 ans, LOEW et ASO [309] avaient reconnu l'existence d'une enzyme bactériolytique dans les cultures du *Bac. radicicola* en decoction de feuilles de petit pois; mais ils n'ont pas démontré que l'action lytique fût transmissible. La présence d'un principe lytique transmissible (bactériophage) dans les tubercules des légumineuses a été signalée la première fois en 1923 par GERRETSEN, GRIJNS, SACK et SÖHNGEN [310] et confirmée ensuite par GRIJNS [311], ISRAILSKY [312], HITCHNER [313], LAIRD [314].

La technique suivie par ces auteurs pour obtenir un bactériophage actif est celle qu'on emploie d'habitude. Des tubercules stérilisés à la surface, sont broyés et ajoutés à un liquide nutritif (décoction de graines de petit pois, ou de jeunes plantes de trèfle, ou solution de mannite à 1% en eau de source, avec 0,05% de nitrate de soude et 0,05% de phosphate bipotassique). Après 5 jours d'incubation à l'étuve on filtre sur bougie et on ajoute quelques cmc. du filtrat à un nouveau liquide de culture ensemencé avec *Bac. radicicola,* que l'on tient encore à l'etuve pendant 5 jours. On filtre et on répète le procédé 10 à 20 fois, en diminuant toujours la quantité de filtrat ajoutée au liquide de culture, jusqu'à ce qu'elle soit reduite à quelques oeses de platine. On obtient ainsi un filtrat capable d'empêcher le développement du *Bac. radicicola* dans les plaques de gélose et parfois aussi de clarifier les cultures liquides. Son action sur les cultures solides déjà développées se manifesterait par l'apparition d'un grand nombre de bactéroides étrangement ramifiés, à aspect de mycelium ([312]).

Certains auteurs ([310], [311], [312]) pensent que le bactériophage isolé des tubercules a une action spécifique et agit seulement sur les bactéries provenant des légumineuses dont on a isolé le bactériophage. D'autres nient, par contre, cette spécificité ([312],[314]). Ainsi le bactériophage isolé par Israilsky était actif sur les cultures dérivant de *Trifolium, Vicia, Pisum, Lupinus, Onobrychis*; le bactériophage que Laird a isolé de *Rhiz. trifolii* agissait aussi sur les cultures de *Rhiz. meliloti* et de *Rhiz. japonicum.* L'activité du bactériophage a été encore constatée en diluitions de $1:10^{-8}$. La réaction qui lui est la plus favorable est pH = 7,6 à 8 ([314]). Il rèsiste à une température de 60° à 65° pendant 15'; sa résistance aux rayons ultraviolets est, au moins, huit fois plus grande que celle des bactéries correspondantes ([310]). La lyse est empèchée, d'après Laird, par la présence de gomme et d'acidité; les milieux dépourvus de mannite (par exemple, l'eau de levure avec des sels mineraux) sont donc les plus appropriés aux recherches. Pour ce qui est de l'origine du bactériophage, Grijns a démontré qu'il manque dans les plantes de trèfle cultivées en milieu stèrile; il y paraît lorqu'on l'y introduit, à la suite d'une inoculation.

Hitchner ([313]) a vu que dans les cultures lysées du *Bac. radicicola* (de *Trifolium pratense*), où les microbes avaient subi une énorme diminution mais n'étaient pas complètement détruits, il pouvait se manifester après quelque temps un processus secondaire de développement d'où dérivaient des bactéries résistantes à l'action lytique. On a ainsi obtenu des souches sensibles et des souches résistantes, les unes et les autres avec les caractères typiques du *Bac. radicicola* et capables de produire des tubercules dans les plantes de trèfle. Les isolements exécutés de ces tubercules des plantes encore jeunes, donnaient des souches homo-

logues; mais si les isolements étaient faits de plantes ayant 6 mois, un quart seulement des cultures isolées des nodules produits par les souches résistantes montrait encore une résistance particulière à la lyse. Ce caractère est donc peu stable et tend à disparaître à la suite d'un développement prolongé des bactéries dans le tubercules.

Pour compléter l'exposition des recherches executées récemment sur le *Bac. radicicola* il y a encore quelque chose à dire. WENIGER ([315]) a étudié les rapports énergétiques qui réglent la fixation symbiotique, et a démontré qu'une partie seulement de l'énergie libérée dans le métabolisme nutritif des microbes est utilisée par ceux-ci pour l'organisation de l'azote. FRAZIER et FRED ([316]) ont confirmé l'extrème lenteur du mouvement dans le sol du *Bac. radicicola,* dont la diffusion est probablement due au déplacement des courants d'eau. HOCQUETTE ([317]) a émis à nouveau l'hypothèse que les tubercules de *Alnus glutinosa* contiennent le *Bac. radicicola.* BURKE et HOHL ([318]) encore une fois, et avec un risultat comme d'habitude négatif, ont tenté d'adapter le *Rhiz. radicicola* à vivre sur des plantes autres que les légumineuses.

VII. — ACTIVITÉ AZOTO-FIXATRICE DES MICROBES DANS LE SOL.

En présence du grand nombre de travaux parus pendant les dix dernières années sur les microbes azoto-fixateurs ou supposés tels, on peut bien s'étonner que le rôle joué par ces microbes dans le terrain ait été si peu étudié.

Quant à l'action fertilisante de la symbiose Leguminéuses — *Bac. radicicola,* on a apporté de nouvelles démonstrations, qui désormais peuvent même sembler superflues, concernant le gain en azote résultant de cette même symbiose. Les résultats de la culture de différentes légumineuses a été une fixation d'azote de 60,4 Kg. par hectare selon LIPMAN et BLAIR ([319]), de 15,6 à 45,9 Kg. selon BROWN ([320]), de 26,8 Kg. selon FRED et GRAUL ([321]). ARNY et THATCHER ([322]) ont rémarqué aussi des gains de 85,1 à 148,9 Kg. d'azote par hectare dans des cultures de trèfle et de luzerne. ALBRECHT ([323]) a constaté des gains de 129,8 Kg. à la suite de trois récoltes de *Soja* et de *Vigna*; et à la suite d'une culture de *Soja* FRED ([324]) a observé des gains de 63,8 Kg. par hectare. D'après BROWN et STALLINGS ([325]), chaque plante de trèfle ou de luzerne fixerait dans le sol de 12 à 25 cg. d'azote.

Mais, tout en considérant comme indiscutable le fait de l'introduction de l'azote atmosphérique dans le sol où l'on cultive les légumineuses, nos connaissances n'ont nullement avancé au sujet du rôle que l'activité microbienne jouerait dans le phénomène en question. Les incertitudes ont été rendues encore plus graves du fait que l'on a démontré avec

certitude que le *Bac. radicicola* dans ses cultures pures est incapable de fixer l'azote. D'un autre côté il faut ajouter que le fait, plusieurs fois remarqué [326, 327, 328, 329] de l'absence de tubercules dans quelques légumineuses des genres *Cercis, Gleditsia, Gymnocladius, Cassia, Caesalpinia*, a été amplement confirmé par les recherches récemment faites par LEONARD et REED [330, 331]. Ces auteurs auraient démontré aussi que le pouvoir fertilisant des plantes dépourvues de tubercules (*Cassia occidentalis, Cassia tora*) n'est en rien inférieur a celui des plantes qui en sont pourvues (*Soja, Crotalaria*).

On ne doit donc pas trouver étrange l'opinion de BEIJERINCK [332] suivant laquelle, pour tout ce qui concerne la fixation de l'azote de la part des légumineuses, il resterait encore à démontrer si ce sont les plantes ou bien les bactéries qui fixent l'azote; peut être, l'activité des microrganismes pourrait-elle se borner à la formation d'hormones spécifiques stimulant la fonction fixatrice des légumineuses.

En passant à la fixation non symbiotique, nous devons signaler, avant tout, quelques recherches qui visent à établir si le phénomène en question n'est pas influencé et de quelle façon, par la présence de plantes en général, ou par les différentes espèces de plantes. D'après les expériences de LÖHNIS [333], de CREUZBURG [334], de STARKEY [335] on devrait exclure tout rapport entre plantes et pouvoir fixateur du sol, tandis que suivant GREAVES [336] et GRAEF [337] ce pouvoir serait plus élevé dans le sol cultivé avec des légumineuses que dans celui cultivé avec des graminées. Par contre, selon PEROTTI [338] ce pouvoir serait plus élevé dans le sol cultivé avec des graminées que dans celui cultivé avec des crucifères ou des légumineuses; il serait notamment intense dans le sol cultivé avec des crucifères d'après POSCHENRIEDER [339], et dans celui avec légumineuses d'après BEIJERINCK [340]. Evidemment, vis-à-vis d'affirmations si contradictoires, il n'est pas possible de tirer une conclusion certaine.

KHALIL [341] aurait constaté que le desséchement du sol en exalte le pouvoir fixateur; cette observation pourrait être probablement mise en rapport avec celle de LEBEDJANTZEW [342] qui a constaté qu'un court desséchement du terrain donnerait lieu à une augmentation de son contenu en azote.

Contrairement aux affirmations de BROWN [343], de BURGESS [344], de GWENN KUHLMAN et KERN [345] concernant les rapports entre la productivité du sol et le pouvoir azoto-fixateur de celui-ci, WAKSMAN et KARUNAKAR [346] ont démontré que la détermination de cette activité du sol ne peut nous donner aucun indice certain à propos de sa fertilité.

Il n'est pas difficile de se rendre compte que la pauvreté des recherches pratiquées jusqu'ici sur le phénomène de l'azoto-fixation dans le sol, aussi bien que l'incertitude des résultats de ces recherches mêmes,

dépendent d'une même cause: l'imperfection et la valeur absolument insuffisante des méthodes que nous avons à notre disposition pour cette étude. En réalité, presque tout le monde reconnaît que les investigations faites avec adjonction de terre à des liquides de culture appropriés, en y dosant ensuite le gain en azote au bout de quelques semaines d'incubation, donnent des résultats qui ne méritent aucune confiance ([33, 347, 348, 349, 350]). Sans répéter ici ce que j'ai dit ailleurs ([351]), il me suffira d'ajouter que d'après les récentes recherches de KRISHNA ([350]) l'ensemencement de quantités très variées d'Azotobacters dans le liquide de ASHBY au 2% de dextrose, n'a aucune influence sur la quantité d'azote fixée au bout de deux semaines d'incubation à 25°. Malheureusement les méthodes de recherche basées sur l'emploi de la terre même comme milieu de culture, n'ont pas une valeur plus remarquable. Parmi ces méthodes on emploie le plus habituellement celle de LIPMAN et BROWN ([352]): on mélange 100 gr. de terre, passée par un tamis à mailles très fines, avec 1 ou 2 grammes de mannite; on additionne de l'eau jusqu'à un certain optimum d'humidité correspondant à peu près aux deux tiers de la capacité d'absorption; on détermine le gain en azote après une période donnée (de 7 à 28 jours) d'incubation à 25°-27°. La structure mècanique, la constitution chimique, les conditions d'aéréation, de température, etc., des échantillons de terre qu'on utilise pour la recherche sont tellement diffèrentes de celles du sol naturel, qu'il est très douteux que les gains en azote constatés de la sorte puissent indiquer le pouvoir fixateur réel du sol lui-même.

Mais ce procédé, ainsi que celui basé sur l'emploi des liquides, est faussé par une autre erreur fondamentale. Pendant la longue période d'incubation, il est certain que dans la terre mélangée avec de la mannite, aussi bien que dans les solutions sucrées ensemencées avec la terre, le développement des Azotobacters devra atteindre le maximum compatible avec les conditions du milieu nutritif, et cela, indépendamment du nombre et de l'activité végétative des cellules microbiennes contenues au début dans l'échantillon. Une petite quantité de germes à l'état de repos améneront au même résultat qu'une très grande quantité de germes actifs. Ce que l'on considere comme la mesure du pouvoir azoto-fixateur d'un terrain, n'est donc autre chose que l'appréciation, dépourvue de toute valeur pratique, de son aptitude à permettre un certain développement d'Azotobacters dans des conditions physico-chimiques tout-à-fait différentes de celles du milieu naturel. On peut donc répéter aussi pour cette méthode ce que WINOGRADSKY ([33]) dit pour la méthode des cultures liquides: elle n'est basée que sur un malentendu, elle est impropre à donner une idée, même sommaire, de l'activité des Azotobacters au sein du sol, soit du pouvoir fixateur de celui-ci.

Plus récemment CHRISTENSEN [353] a proposé une autre méthode d'évaluation de l'activité de la microflore fixatrice du sol. Il ajoute 2% de mannite à un échantillon de terre; il en porte l'humidité jusqu'au point optimum et, pendant un mois environ, il dose tous les cinq jours, par l'oxydation avec du permanganate de potassium, la mannite qui n'est pas encore décomposée. Mais évidemment, l'objection déjà élevée contre la méthode de LIPMAN et BROWN, qui emploient un matériel dont la constitution physico-chimique est différente de celle du terrain naturel, est valable aussi pour la méthode de CHRISTENSEN. Il faut encore ajouter qu'on n'a pas démontré l'existence d'un rapport constant entre la mannite détruite et l'azote fixé dans les conditions du procédé de CHRISTENSEN.

Bien à raison, WINOGRADSKY [19] a insisté sur la nécessité de tenir compte, dans l'étude du pouvoir fixateur du sol, de deux facteurs essentiels: le rendement du processus, c'est-à-dire le rapport de l'azote fixé à la substance énergétique consommée, et son énergie, c'est-à-dire le temps nécessaire à la consommation d'une dose déterminée de la substance énergétique. Il a obtenu des résultats satisfaisants, en utilisant les cultures sur plaques de silice, ensemencées avec un poids déterminé de terre, et en dosant l'azote après un certain délai d'incubation à 28°-30°; comme terme de comparaison, il a établi que pour les terres les plus actives, l'ensemencement d'un gramme sur de grandes plaques de silice contenant 2 gr. de mannite, donnait lieu à une fixation de 20 mg. d'azote, au bout de 120 heures.

Mais, dans une communication ultérieure [33], WINOGRADSKY lui même, avance l'opinion que la recherche chimique est superflue et que la densité des Azotobacters, mise en évidence par un simple dénombrement des germes sur les plaques de silice, est l'expression la plus directe et la plus sûre du pouvoir fixateur du sol. Les terres actives se caractérisent par une densité maximum d'Azotobacters (2000 ou plus par gramme); au contraire, dans les terres où ces germes manquent totalement ou sont plutôt rares (quelques centaines par gramme) le pouvoir fixateur est absent ou est très limité. Je crois pouvoir faire remarquer que ce parallélisme pourrait être admis seulement après avoir établi de façon certaine: 1) que l'azoto-fixation dans le sol est une fonction exclusive des Azotobacters; 2) que l'activité végétative de ces microbes sur les plaques de silice, c'est-à-dire leur aptitude à se développer dans ce milieu nutritif qui leur est particulièrement favorable, est une preuve certaine de leur activité fonctionnelle dans le sol; 3) que dans l'activité fixatrice des différentes souches d'*Azotobacter* existant dans les divers terrains, il n'y a pas de différences qui puissent contre-balancer ou bien intervertir tout à fait le résultat d'une préponderance éventuelle de nombre des microbes.

Mais tout cela est bien loin d'être prouvé; et il y a même la plus grande probabilité que ce soit tout à fait le contraire.

En resumé: nous n'avons pas à notre disposition, pour le moment, une méthode qui nous permette d'évaluer exactement l'activité fixatrice des microbes du sol.

Mais, que savons-nous de bien sûr, à propos de l'existence même de cette activité microbienne dans le sol ou, du moins, à propos de sa véritable portée ? On pourra trouver assez étrange qu'après presque 50 ans d'études faites sur ce sujet (les premières recherches de BERTHELOT [354] sur la fixation de l'azote atmosphérique par les microbes du sol remontent à 1885) l'on se pose encore une question pareille. Cependant, une discussion rapide, concernant les faits les mieux acquis à ce propos, et déjà exposés dans les paragraphes précédentes, suffira à démontrer l'incertitude de nos connaissances actuelles, sur la fixation microbienne de l'azote dans le sol.

En premier lieu, une simplification considérable du problème semble s'imposer: il faudrait désormais exclure sans plus toute participation au processus naturel d'azoto-fixation, de ces nombreux microbes (schizomycètes et eumycètes) très communs dans le terrain, qui sont aptes à utiliser les plus différents composés azotés organiques et inorganiques, mais qui ne peuvent pas se développer sur les milieux de culture dépourvus ou très pauvres en azote, et aux cultures desquels, plusieurs chercheurs ont crû pouvoir attribuer une certaine aptitude à assimiler l'azote élémentaire. Tout en admettant cette aptitude, cela ne démontrerait aucunement qu'elle puisse se manifester dans le sol où les microbes en question trouvent, habituellement, une réserve suffisante d'aliments azotés qui leur conviennent certainement plus que l'azote élémentaire. Mais le fait même de l'aptitude fixatrice de ces microbes a été à plusieurs réprises nié, par d'anciens et de récents travaux. Dans ces derniers temps, il y a eu en outre la mise en évidence décisive des sérieuses causes d'erreur qui ôtent toute valeur aux prétendues démonstrations du pouvoir fixateur de ces microbes dans des milieux nutritifs relativement riches en azote combiné.

Il est donc fort probable que la fonction azoto-fixatrice puisse être considérée comme un attribut exclusif de deux groupes de schizomycètes: les *Azotobacter* et les *Clostridium*: leur activité dans les cultures de laboratoire et dans la terre mélangée avec des matériels énergétiques (mannite, sucre, acides organiques, etc.) ne permet aucun doute. Mais, en revenant sur la question que nous nous sommes posée tout-à l'heure, quelle est leur activité dans les conditions du milieu naturel ? Comment vont-ils exercer leur pouvoir fixateur dans le sol ?

En ce qui concerne les Clostridiums, nous avons vu qu'on peut en affirmer simplement l'existence dans le sol, sans même pouvoir dire s'ils

s'y trouvent dans des conditions de vie végétative ou sous la forme de spores, et que les assertions des auteurs qui voudraient leur attribuer une fonction fixatrice importante dans les terrains acides ou dans tous les terrains en général, n'ont aucune base sérieuse. Nous ne savons rien — a écrit récemment BEIJERINCK ([355]) — à propos de la vie des fixateurs anaérobies dans le sol; nos connaissances se basent sur des recherches de laboratoire poursuivies dans des conditions tout à fait différentes de celles du milieu naturel. Et WINOGRADSKY ([33]) confirme le manque d'observations sûres à propos du rôle des Clostridiums dans le sol; il admet, comme une simple hypothèse, qu'ils puissent agir dans les terrains plastiques, argilleux, humides, mais il affirme que dans les terrains normaux, aérés, non saturés d'humidité ce sont bien sûrement les fixateurs aérobies qui prédominent. Une terre qui ne serait capable que de fixation anaérobie, rentrerait tout de même dans la categorie des terres à pouvoir fixateur bien faible. Ajoutons, que, même pour affirmer ce qui précède, il faudrait avoir prouvé que les Clostridiums sont capables de provoquer une augmentation d'azote, même minime, dans le sol, dans les conditions normales, et sans aucune modification apte à stimuler artificiellement les activités microbiennes. Or je crois que cela n'a jamais été démontré, jusqu'ici.

Par éliminations successives, WINOGRADSKY parvient à établir que le groupe des *Azotobacter* reste seul comme fixateur vraiment actif dans les conditions normales du sol. En effet, et ainsi qu'on l'a déjà dit, il considère l'évaluation numérique des Azotobacters comme un indice certain du pouvoir fixateur du sol. Or, il est hors de doute que ces microbes se différencient de tous les autres étudiés jusqu'ici, par l'activité fixatrice plus énergique de leurs cultures, par l'utilisation plus économique des matériels énergétiques, par la facilité d'adaptation à certaines conditions du milieu (aération, humidité, température) qui se vérifient, du moins à certaines époques déterminées, dans le terrain. Mais, cela ne démontre pas encore que dans le terrain même ils rencontrent les autres conditions qui leur sont nécessaires pour manifester, en proportions sensibles, leur activité.

Une première difficulté consiste ici à établir quelles sont les sources d'énergie que les Azotobacters rencontrent dans le sol. Est-ce que du fait d'avoir constaté leur aptitude à pousser vigoureusement aux dépens de composés ternaires à constitution très simple (acide acétique, butyrique, lactique, succinique, alcool étylique, butylique, et produits similaires de décomposition des substances végétales dans le sol), nous sommes autorisés, ainsi que WINOGRADSKY le voudrait ([356]), à considérer le problème resolu sans plus? Dans les cultures artificielles faites dans des conditions de température, d'humidité, d'aéréation les plus favorables,

l'utilisation d'un aliment le plus approprié au développement des Azotobacters, tel que la mannite, ne permet, de règle, une fixation d'azote supérieure à 1/100 de la quantité du materiel énergétique consommé. Or, si l'on pense à tout ceci, n'a-t-on pas le droit de douter que dans le sol, où toutes les autres conditions physico-chimiques sont beaucoup moins favorables, les produits de la décomposition du matériel végétal (moins appropriés que la mannite à l'alimentation des Azotobacters), se trouvent communement en proportions suffisantes pour répondre aux exigences énergétiques d'une fixation d'azote appréciable? Nous avons deja dit que les recherches exécutées à ce propos ([84], [86], [87]) n'ont pas donné des resultats convaincants. D'ailleurs, nous avons constaté ([357]) que des échantillons de terre opportunément humectés et gardés pendant 10 à 20 jours à l'étuve à 30°-32° ont subi une augmentation insignifiante du nombre des Azotobacters (de 800-1000 à 5000-8000 par gramme de terre), et que leur contenu en azote n'a subi aucune modification. Il était pourtant suffisant d'ajouter un peu de mannite pour voir le nombre des Azotobacters s'élever, en peu de jours, jusq'à 45, 80, 100 millions par gramme, et pour noter une petite, mais très certaine fixation d'azote.

Mais ce n'est pas encore assez! Au cours des expériences où l'on utilise la terre mannitée, l'excès d'un matériel énergétique approprié favorise l'activité chimio-syntétique des Azotobacters, en donnant lieu au processus de fixation. Dans le sol, au contraire, là où les matériaux hydrocarbonés sont moins abondants et moins facilement utilisés, l'action des composés azotés assimilables (ammoniaque, nitrates, amino-acides) doit se faire ressentir sur les Azotobacters. Or, soit que ces composés agissent, ainsi que WINOGRADSKY le voudrait ([33]), en favorisant le développement de la microflore antagoniste (qui empêche ou arrête tout à fait l'activité des microbes fixateurs), soit, qu'au contraire, ces composés, ainsi que BONAZZI ([106]) et d'autres auteurs l'affirment, soient utilisés de préférence à l'azote élémentaire par les Azotobacters, le résultat doit être identique: une suppression ou limitation considérable de l'activité fixatrice des *Azotobacter*.

Il y a encore une considération à faire, qui nous laisse toujours dans le doute à propos de la véritable efficence des Azotobacters dans le sol, et qui, jusqu'ici, avait toujours échappé à l'attention de ceux qui se sont occupés de la question. Personne, en effet, n'a tenu compte du facteur quantitatif, savoir du nombre vraiment limité des *Azotobacter* normalement renfermés dans le sol. Dès les anciennes recherches le fait semblait démontré; les recherches plus récentes et plus précises confirment de la façon la plus sûre que dans plusieurs terrains (par ex. dans 25% des terrains italiens, et dans le 50% ou plus d'autres terrains) les Azotobacters font défaut; rarement elles dépassent le chiffre de 5000 par gramme de

terre et dans les terrains normaux la moyenne atteint environ 2000 par gramme.

Or, nous savons que, d'ordinaire, un gramme de moût en pleine fermentation ne renferme pas moins de 100 à 500 millions de saccharomycètes ([358]), que la légère acidification d'un gramme de lait gardé à 25° pendant 24 heures est due à 200-800 millions de ferments lactiques ([359], [360]), que dans les fromages en voie de maturation on a calculé de 250 à 4580 millions de microbes par gramme ([361], [362], [363]), et que dans le fumier bien consommé, il y a de 250 à 11.600 millions de microbes per gramme ([364], [365], [366]). Enfin, l'on sait que, par l'action de 5 millions au moins de germes décomposants contenus dans un gramme de terre ayant reçu du fumier (ce chiffre obtenu à l'aide de nos méthodes imparfaites de dénombrement est sans doute de beaucoup inférieur au chiffre réel), il ne se produit, dans les 24 heures, pas plus d'un vingtième de milligramme d'anhydride carbonique ([367]); l'on sait aussi que le gain de quelques décigrammes d'azote de la part d'une plante de lêgumineuses ([325], [368], [369]) est en rapport avec le développement, dans les tubercules des racines, de 15-20 milliards, au moins, de bactéroides ([370]). Ces données, et tant d'autres analogues que l'on pourrait rapporter ici, montrent que dans chaque phénomène de transformation de la matière, les microbes ne produisent des effets sensibles qu'autant qu'ils se multiplient activement, atteignant des chiffres qu'on peut évaluer par dizaines ou centaines de millions pour chaque gramme du milieu. Il y aurait une seule exception à cette règle génerale: les Azotobacters devraient jouer, dans le sol, le rôle de fixateurs, tout en gardant leur nombre extrèmement bas, de quelques milliers et souvent même de quelque centaine par gramme de terre.

L'on pourrait objecter que ces chiffres qui résultent de numerations en cultures ne représentent pas le nombre des cellules d'*Azotobacter* contenues dans le sol, mais le nombre des groupements cellulaires. Celle semble être, du moins, l'opinion de WINOGRADSKY ([45]); en effet, dans ses mémoires il fait allusion plusieurs fois à la présence dans le sol de gros coccus réunis en amas très compacts et difficiles à désagrèger même par agitation prolongée dans les liquides, amas qui seraient, au moins en partie, de véritables colonies d'*Azotobacter*. Mais voici la reponse à cette objection: 1) Les recherches de DIANOWA et WOROSCHILOWA ([159]) ont démontré que ces grosses formes globuleuses ne sont pas des Azotobacters. 2) Dans les milieux de culture les plus divers, les Azotobacters se présentent réunis en colonies sèches ou muqueuses, les unes et les autres sont pourtant très faciles à délayer dans de l'eau où, après une agitation de courte durée, les cellules se montrent isolées ou réunies en groupes de deux et parfois de quatre. Il n'y a donc aucune raison de supposer que la façon d'être des Azotobacters dans le sol doive être différente. 3) Si

l'on voulait admettre que le sol contient les Azotobacters sous la forme de colonies tellement épaisses et compactes qu'on ne puisse les dissocier en leurs éléments, pas même par agitation violente dans l'eau pendant une demie heure, il est évident qu'en passant de la terre humide au tamis en présence de 1% de mannite, on ne pourrait aucunement altérer cet état d'aggrégation cellulaire. Par conséquent, lorsqu'un échantillon ainsi traité est porté à l'étuve à 34°, l'action favorable de l'aliment hydrocarboné devrait s'effectuer simplement par une augmentation du nombre des germes de chaque groupement, de sorte que le nombre des colonies décelable à l'examen cultural ne devrait pas augmenter sensiblement. Au contraire, les échantillons de terre qui donnent, dès le début, quelques centaines ou quelques milliers de colonies d'*Azotobacter* par gramme, en donnent, après l'adjonction de mannite et le séjour de quelques jours à l'étuve, plusieurs dizaines de millions. 4) L'examen microscopique de ces échantillons de terre, dont un gramme donne lieu à la production de 50 à 150 millions de colonies d'Azotobacters, ne montre pas une augmentation sensible ni par rapport au nombre, ni aux dimensions des groupes ténaces de grands coccus, qui, en somme, ne peuvent pas être considérés comme le point de départ des colonies des Azotobacters [370].

On peut encore prévoir une deuxième objection. La pauvreté numérique des Azotobacters pourrait être compensée par la continuité de leur fonction: de cette façon un rendement en azote, extrèmement faible mais continuel pourrait représenter un bénéfice positif pour le sol. Or, voici un simple calcul qui n'a nullement la prétention d'être exact, mais qui peut avoir une certaine valeur au point de vue de l'orientation des idées. Des nombreuses expériences m'ont permis d'établir que dans 10 grammes de terre mélangés à 2% de mannite et gardés pendant 10 jours à 30°-34° dans des conditions d'humidité appropriées, le contenu total moyen d'Azotobacters, qui était au début de 14.300 s'élevait jusqu'à 876.000.000, et, en même temps, l'on obtenait un gain moyen de 1,4 mg. d'azote [357]. En partant de ces données, si on évalue à environ 600 Kg. par mètre carré le poids de la couche de terre qui est le siege de l'activité microbienne, et si l'on suppose que les Azotobacters trouvent dans le sol, pendant 160 jours de l'année, des conditions d'humidité et de température favorables à leur développement et à leur activité, on arrive facilement à calculer [370] qu'un hectare de terrain avec un contenu de 2000 *Azotobacter* par gramme, pourrait fixer dans une année, par l'action de ces microbes, environ 290 grammes d'azote, c'est-à-dire de 1/35 à 1/140 des quantités (10 à 40 Kg.) dont on pense que cette surface de terrain puisse s'enrichir annuellement [371]. Le chiffre de 2000 *Azotobacter* par gramme (correspondant à celui constaté par Winogradsky dans les terrains actifs, et supérieur au nombre moyen constaté par moi dans les

terrains italiens) peut être quelquefois dépassé; mais on ne doit pas oublier qu'on a pris pour base du calcul l'activité des microbes en conditions tellement favorables de milieu nutritif (provision abondante de mannite, optimum de température, d'humidité, d'aération) que, vraisemblablement, elles ne se vérifient jamais dans le sol. Il suffit de penser que les terres même utilisées pour les expériences, mais sans adjonction de mannite, après un long séjour à 30°-34° en milieu humide, ne présentaient qu'une augmentation insignifiante du nombre des Azotobacters et aucune modification du contenu en azote, pour se persuader que le calcul exposé plus haut sur la quantité d'azote assimilable par les Azotobacters dans le terrain, pèche certainement par excès.

De toutes ces considérations je ne veux pas encore tirer de conclusion trop absolue. Mais je crois d'être pas trop loin de la vérité, en affirmant que, si d'une part les recherches les plus récentes nous amènent à réduire considérablement le rang des microbes fixateurs, probablement entre les bornes des deux groupes, dont l'*Azotobacter chroococcum* et le *Clostridium pasteurianum* sont les représentants typiques, d'autre part on peut penser aussi que le rôle naturel de ces microbes comme fixateurs de l'azote dans le sol, n'est pas aussi important qu'on le croyait jusqu'à présent. Il paraît en somme très douteux que le phénomène de fixation de l'azote atmosphérique dans le sol puisse s'identifier tout simplement (sans parler de l'activité de la symbiose Légumineuses – *Bac. radicicola*) avec la fonction des *Azotobacter*, avec la coopération, ou non, des *Clostridium*.

Je ne veux pas donner ici trop d'importance aux résultats de quelques unes de mes recherches [372] encore incomplètes, mais qui sembleraient démontrer vraiment la possibilité (admise jadis par d'autres auteurs, quoique insuffisamment prouvée) d'une fixation de l'azote élémentaire dans le sol par suite de processus physico-chimiques [373, 374]. Je parlerai seulement d'une de ces expériences, en remarquant que les chiffres rapportés correspondent tous à la moyenne de 6 ou 8 déterminations au moins. Dix grammes de terre desséchée à l'air depuis un mois, renfermaient 14,6 mg. d'azote organique (dosé par la méthode de KJELDAHL) et 15,4 mg. d'azote total (dosé par la méthode de JODLBAUER). Des échantillons de la même terre, humectés avec le 50% d'eau distillée et laissés, pendant 12 jours, exposés en couche mince, à température ordinaire, ont montré une augmentation de 1,2 et 0,8 mg. d'azote respectivement dans les deux essais. Des échantillons humectés, non plus avec de l'eau mais avec une solution de sublimé corrosif au 2%, ont donné un gain en azote identique. Un gain à peine inférieur ont montré les échantillons gardés dans un courant d'air purifiée de toute forme d'azote combiné. Les échantillons qui ont été gardés dans une atmosphère d'hydrogène n'ont donné aucun gain. La même terre stérilisée à sec, pendant une heure à 180°,

avait subi une légère perte d'azote: les déterminations de l'azote organique et de l'azote total dans les échantillons de 10 gr. (poids initial) donnaient respectivement 13,8 et 15,2 mg. Mais des échantillons identiques, humectés à l'eau distillée et exposés à l'air pendant douze jours, ont acquis à nouveau 2,0 et 1,6 mg. respectivement d'azote.

En attendant que le problème soit exploré plus à fond, je peux répéter maintenant, mais avec plus de certitude, ce que j'écrivais il y a dix ans [374]: c'est-à-dire que l'étude des processus physico-chimiques de fixation de l'azote dans le sol va nous donner peut-être des résultats très intéressants. Cette étude devra être coordonné avec celle de l'activité éventuelle des microbes par lesquels les produits des processus physico-chimiques peuvent être ultérieurement élaborés.

VIII. — Applications pratiques.

Alinit, All crop Farmogerm, Alphano Humus, Ammoniogen, Azofix, Azoform, Azogen, Azogenin, Azonutrin, Bac-sul, Bac-su-muh, Bacto-natural, Chilinit, Composite Farmogerm, Dextrogerm, Earp-Thomas Inoculation, Farmogerm, Geonutrin, Heyl's Concentrated Nitrogen Producer, Hu-fi-teria, Humogen, Humo-phos, Inoc-sul, Kondine Fertilizer, Legumin, Lime Fertile, Multicreszenz, Nitro-sulfo-culture, Nitrobacterine, Nitro-bacter-Soil-Vaccine, Nitrobion, Nitrofer, Nitrogerm, Phos-pho-germ, Soilgro, Soil-vaccine, Soilvita, Sulphogerm, Terra Vim, U-Nitragin, Verdure, Vitamite, Warner's Limoid Inoculated..... voilà une liste alphabétique (certainement incomplète) des produits de l'industrie microbiologique, pour la pluspart americains, lancés sur le marché comme des moyens pour ensemencer le terrain, et, bien entendu, très efficaces pour favoriser le développement des légumineuses ou de toutes les plantes indistinctement. Mais, comme ils se sont démontrés tous, on presque tous, complètement inefficaces (voir à ce propos la revue de De' Rossi [375] sur les observations et les recherches parues jusqu'à 1923, et les travaux ulterieurs de Kronberger [376], de Jones [377], de Zucker [378], de Rossi [379], d'Edman et Brown [380], etc.), il paraît tout à fait inutile de s'arrêter pour relever, avec les auteurs ci dessus, le nombre plus ou moins grand de microbes contenus dans ces préparations, et la présence ou l'absence dans ces dernières de germes tuberculigènes, d'Azotobacters, ou d'autres prétendus fixateurs, etc.

En passant du champ industriel à celui de la recherche scientifique, nous pouvons dire que (exception faite pour quelques affirmations, isolées et restées sans suite, à propos de résultats satisfaisants obtenus en ajoutant au terrain des Azotobacters éventuellement mélangés avec des microbes décomposant la cellulose [381, 382], les chercheurs modernes ont

amplement confirmé l'opinion, établie depuis longtemps, de l'inutilité absolue d'ensemencer le sol avec des Azotobacters ou d'autres microbes, considérés avec ou sans raison comme pourvus d'un pouvoir fixateur ([383], [384], [385], [386], [387]).

Par contre, les *Azotobacter* ont pu être bien utilisés dans la pratique du laboratoire, pour la mise en évidence de certains caractéres chimiques du sol, suivant un procédé proposé par CHRISTENSEN ([388]). Ce procédé est bien connu dans sa première application à la détermination du contenu du sol en chaux utilisable par les plantes. A 50 cmc. d'une solution de mannite à 2%, avec 0,02% de phosphate bipotassique, on ajoute une quantité de terre correspondant à 5 gr. desséchés à l'air; on ensemence avec une oese d'une culture d'*Azotob. chroococcum*; en même temps, on prépare une culture identique pour le contrôle, avec adjonction de 0,2 gr. de carbonate de chaux. Si, au bout de 3 à 5 jours d'incubation à 25°-26°, on n'observe pas dans la première culture le développement de la membrane caractéristique de l'*Azotobacter*, et si cette dernière apparaît par contre dans la culture de contrôle, on doit en conclure que le terrain ne contient pas une quantité suffisante de chaux utilisable par les microbes, aussi bien que par les plantes supérieures.

CHRISTENSEN avait démontré aussi que la culture d'*Azotobacter* en solutions nutritives dépourvues de phosphore et additionnées de terre (suffisamment pourvue de chaux) était une méthode très convenable pour établir le contenu en phosphore assimilable, de la terre même. Ce procédé a été largement appliqué par NIKLAS, POSCHENRIEDER et CZIBULKA ([389]) avec des résultats satisfaisants, surtout en utilisant un liquide nutritif où la mannite était remplacée, en partie, par le lactate de soude. Une autre méthode proposée par NIKLEWSKI ([390]) et par STOKLASA ([391]) consistait dans l'adjonction de 10 gr. de terre à 100 cmc. d'une solution de mannite à 2% sûrement dépourvue de phosphore, stérilisation, inoculation avec *Azotobacter* et dosage de l'azote fixé, après 20 à 30 jours d'incubation. Ce procédé a été largement contrôlé par WAKSMAN et KARUNAKAR ([346]) avec de bons résultats. TRUFFAUT et BEZSSONOFF ([392]) ont proposé une modification de cette méthode, avec inoculation de quatre différents microbes fixateurs.

Des méthodes analogues ont été étudiées par d'autres auteurs ([393], [394]); mais j'estime inutile d'en parler, puisque leur importance, et probablement aussi l'importance des méthodes précédemment décrites, parait fort réduite vis-à-vis de la méthode des cultures sur plaques de terre moulée qui, dans cet ordre d'investigations, trouvera sans doute une application très utile. Voici la description que WINOGRADSKY ([33]) donne à propos de l'emploi de ces cultures pour la recherche des facteurs limitant la fertilité du sol, et notamment la chaux et l'acide phosphorique. On

fait passer une quantité suffisante de terre par un tamis de 2 mm.; on y incorpore soigneusement 5% de poudre d'amidon ou 1% de mannite; on divise en trois (ou quatre) portions, dont l'une est travaillée en pâte avec de l'eau distillée; la seconde de même, mais après addition de 2 à 3% de carbonate de chaux; enfin la troisième est rendue pâteuse au moyen d'une solution à 1‰ de phosphate mono- et bisodique donnant un pH égal a 7,0-7,1. On peut ajouter encore une quatrième additionnée d'un sel potassique, ou d'autres encore, amendées par des combinaisons de ces substances minérales. Les pâtes sont formées en plaques de la manière deja décrite.

Il est évident qu'au bout de 48 heures à 30°, toutes les plaques vont montrer un développement normal des colonies des Azotobacters, à condition que le terrain contienne ces microbes, et qu'il soit suffisamment pourvu de chaux, d'acide phosphorique, etc.; si quelqu'un de ces éléments mineraux fait défaut, on le constatera par le manque de développement dans les plaques où il n'aura pas été ajouté. Stöckli (395), Ziemiecka (396), Jones (397) ont reconnu que cette méthode est très sensible et très exacte lorsqu'on l'applique pour déterminer l'insuffisance de phosphates dans le sol.

En ce qui concerne l'inoculation des légumineuses, il n'y a pas, dans ces dix dernières années, de nouveautés dignes de remarque. Nous sommes désormais bien fixés sur les différentes manières de préparations des cultures du *Bac. radicicola*, sur la technique de la contamination des sémences, sur l'importance des engrais minéraux les plus appropriés. Il y a encore à discuter si ce soit plus convenable l'inoculation de cultures microbiennes, ou le transport de la terre; Alway et Nees (398) ont comparé encore une fois les deux méthodes pour la culture de la luzerne et ils ont obtenu des résultats également satisfaisants. Sans doute, les échecs qui ont suivi l'emploi des cultures, dépendent, en général, de la mauvaise qualité des préparations du commerce ou de quelques erreurs de technique concernant l'utilisation des préparations mêmes. Les cultures sûrement pures, bien entretenues, et rationellement utilisées donnent des résultats aussi satisfaisants que le transport de la terre; en plus, elles offrent l'avantage qui n'est pas à négliger d'une moindre depense et la possibilité d'éviter la transmission de microbes, de semences et d'insectes nuisibles.

Il est certain, d'ailleurs, que l'extrême délicatesse des procédés de préparation des cultures à employer pour l'inoculation des légumineuses et la difficulté d'apprécier l'efficacité des préparation du commerce, sont de plus en plus manifestes avec les récents progrès de nos connaissances: 1° sur la multiplicité des espèces des germes tuberculigènes; 2° sur l'existence (même si l'on veut admettre encore l'unique espèce *Bac. radicicola*) d'un très grand nombre de variétés physiologiques non plus bornées, désormais,

aux groupes déjà assez nombreux des inoculations croisées, mais s'étendant aussi aux souches microbiennes dérivées des plantes d'un même groupe, ou d'une même espèce de plantes, ou bien des tubercules d'une même plante; 3° sur les grandes différences existant dans le pouvoir contaminant et dans l'activité fixatrice des différentes souches d'une même variété; 4° sur la dissociation du pouvoir infectant de certaines cultures et de leur pouvoir azoto-fixateur.

A vrai dire, pour les cultures des germes tuberculigènes, pour les nitragines du commerce, le contrôle microscopique et en cultures de leur pureté n'est pas suffisant comme en d'autres cas; en effet il ne nous dit rien sur l'aptitude de ces germes à contaminer une légumineuse déterminée. L'essai d'inoculation (si l'on pouvait l'exécuter dans la pratique agraire) ne peut être lui même consideré, désormais, comme une preuve certaine de l'efficacité d'une préparation, car nous connaissons l'existence de races du *Bac. radicicola*, aptes à produire des tubercules tout en n'ayant qu'un pouvoir azoto-fixateur très pauvre et même nul. Par conséquent, celui qui utilise ces cultures du commerce n'a aucune garantie, en dehors de celle qui dérive de l'habilité technique, du soin, et de l'honnêteté du préparateur, qui, par le choix de souches appropriées et par leur propagation suivant les règles les plus strictes de la technique bactériologique, peut fournir au consommateur un produit pur et sûrement actif.

Malheureusement il n'en est pas toujours ainsi; au contraire, nous avons vu que le marché est envahi par des produits impurs et inactifs. Il ne faut pourtant pas verser dans le tort d'un pessimisme exagéré, en concluant que l'emploi des cultures de *Bac. radicicola* doit être tout simplement supprimé. Il ne faut pas oublier que précisement aux États Unis d'Amérique, à côté de l'activité plutôt louche de ceux qui débitent des préparations qui constituent de véritables tromperies pour la bonne foi des agriculteurs, il y a une oeuvre vraiment admirable accomplie par un réseau très étendu de Stations expérimentales agricoles. Ces dernières, qui s'occupent d'une façon très profitable pour le progrès de chaque branche des sciences agricoles (y comprise la microbiologie), s'intéressent aussi à la diffusion et à la propagande des applications pratiques qui s'y rattachent. Or, la préparation des nitragines étant confiée à ces Stations, c'est-à-dire aux mains d'un personnel technique habile et cosciencieux, a répondu totalement à ce qu'on en attendait; elle a atteint une large diffusion, à la plus grande satisfaction des agriculteurs pratiques. Il suffira de rappeler ici l'exemple de la Station du Wisconsin qui a fourni, sous la forme de culture en gélose, le matériel pour l'inoculation de 8 hectares de terrain, en 1916, et de 20.200 hectares en 1926 [399]. D'après THORNTON [400], en Angleterre aussi l'emploi des cultures du *Bac. radicicola*,

surtout pour l'inoculation de la luzerne, est maintenant très répandu; et de même en Allemagne, on utilise largement la nitragine HILTNER et d'autres préparations de bonne qualité qui, d'après NOLTE et MUNZBERG [401], donnent des résultats très satisfaisants.

Jusqu'à présent, en Italie, en dehors de quelques essais faits avec des préparations étrangères qui ont donné toujours un résultat négatif (je rappelle, parmi les plus récents, ceux de VIVENZA [402] avec l'*Azotogen*, et ceux de ROSSI [379] avec une *Nitragin* américaine et le *Farmogerm*) on n'a rien fait pour resoudre pratiquement et sérieusement le problème de l'inoculation des terrains nouveaux ou nouvellement cultivés en légumineuses. Or, comme ce problème — dans cette heure où l'on s'occupe avec tant de ferveur des oeuvres d'assainissement agraire — va acquérir une importance toujours plus grande, je me permet d'exprimer le voeux qu'on se préoccupe sans delai de combler cette lacune, de la seule manière qui puisse être vraiment efficace, en confiant la préparation des cultures à débiter aux agriculteurs, à une institution scientifique qui s'en occupe avec toutes les garanties de sérieux et de compétence.

IX. — CONCLUSIONS.

1. — La technique expérimentale adoptée dans un grand nombre de recherches pratiquées jusqu'ici pour démontrer le pouvoir azotofixateur des microbes, présente de graves causes d'erreur, et précisément:

a) les microbes peuvent assimiler, de l'air et surtout de celui des laboratoires s'il n'est pas convenablement purifié, des quantités appréciables de composés azotés;

b) certains milieux de culture renferment des composés azotés volatils que les microbes vont assimiler pendant le développement en culture et qui, dans l'intervalle, se dégagent des contrôles;

c) plusieurs milieux de culture, surtout ceux qu'on prépare avec l'extrait de terre, contiennent des nitrates et différents composés azotés organiques, dont on ne peut doser, ou très imparfaitement, l'azote avec le KJELDAHL ou les méthodes similaires; cet azote, par contre, est totalement mis en évidence dans les composés organiques du plasma cellulaire, après son assimilation par les microbes.

Nous sommes donc autorisés à accueillir avec beaucoup de reserve, toute prétendue démonstration du pouvoir fixateur des microbes, qui est fondée sur la constatation d'un petit gain d'azote dans les cultures faites en extrait de terre ou dans d'autres milieux contenant des proportions notables d'azote combiné. Une appréciation sûre du pouvoir fixateur des microbes ne peut se baser que sur des recherches pratiquées à l'aide de

milieux nutritifs dépourvus d'azote (ou n'en contenant que très peu), et en présence d'air exempt d'azote combiné.

2. — Plusieurs auteurs ont attribué un certain pouvoir fixateur à une grande quantité de microbes du sol, les plus communs, schizomycètes, hyphomycètes, torules, algues. Il est extrêmement probable que les causes d'erreur mentionnées plus haut ont altéré les résultats des recherches de ces auteurs. D'ailleurs, la plupart de ces recherches, anciennes ou récentes, sont contredites par d'autres exécutées avec une technique expérimentale rigoureuse.

3. — D'après nos connaissances actuelles, nous pouvons affirmer que l'aptitude à organiser l'azote élémentaire, au moins en des conditions déterminées de milieu nutritif, est une propriété incontestable de deux groupes de germes: les *Azotobacter* (aérobies) et les *Clostridium* (anaérobies).

4. — Pendant les dix dernières années, l'étude des *Azotobacter* a fait des progrès sensibles. On y a introduit une technique nouvelle et précise pour leur recherche en cultures; on a élaboré d'intéressants travaux sur leurs processus nutritifs; on a déterminé plus exactement les conditions qui règlent leur développement et leur activité fixatrice. On a reconnu que pour les *Azotobacter* l'azoto-fixation est une fonction non essentielle qui se manifeste seulement en l'absence de quantités suffisantes d'azote combiné utilisable.

5. — Par des méthodes nouvelles et exactes de numération en cultures des *Azotobacter*, on a fait une vaste enquête sur le nombre de ces microbes dans les terrains italiens. On a constaté ce qui suit: 22,8% des 189 échantillons examinés étaient dépourvus d'Azotobacters; 9% en contenaient plus de 5000 par gramme de terre; le contenu moyen etait de 1815 par gramme de terre (desséché à l'air). Ces données concordent sensiblement avec celles qu'on a tirées des recherches analogues poursuivies en France et aux États Unis d'Amérique, aussi bien qu'avec celles précédemment obtenues en d'autres pays, par la méthode des dilutions.

6. — Nos connaissances sur le *Clostr. pasteurianum* et sur les ferments butyriques azoto-fixateurs analogues, demeurent encore presque sans changement depuis ces vingts dernières années. Il nous reste encore à faire l'étude quasi complète de l'activité naturelle de ces microbes.

7. — Au cours des recherches récentes sur le *Bac. radicicola* on n'a pas toujours évité les causes d'erreur concernant son isolement des tubercules; par conséquent, on a encore décrit des espèces venant contaminer les cultures, comme des germes tuberculigènes nouveaux.

8. — La question de l'unicité ou de la pluralité des espèces des microbes producteurs de tubercules des légumineuses ne peut pas être con-

sidérée comme résolue. Il y a encore des auteurs qui admettent l'existence d'une seule espèce, *Bac. radicicola*, avec plusieurs variétés physiologiques; d'autres chercheurs ont adopté les deux espèces *Rhiz.* (*Bac.*) *radicicola* et *Rhiz.* (*Bac.*) *Beijerincki*, suivant l'ancienne distinction de HILTNER et STÖRMER; d'autres encore, les deux espèces déterminées par LÖHNIS et HANSEN, *Rhiz. radicicola* péritriche, particulier aux légumineuses européennes, et *Rhiz. japonicum* monotriche, particulier aux légumineuses américaines et asiatiques; d'autres enfin, ont distingué plusieurs espèces dont les caractères différentiels ne semblent pourtant pas avoir une grande valeur.

9. — Les recherches récentes, concernant la différenciation et le groupement des germes tuberculigènes sur la base de leurs caractères physiologiques, ont démontré que, même à ce point de vue, nous nous trouvons en face d'un problème très compliqué. Maintenant, en effet, on arrive à douter du parallélisme qui paraîssait démontré, entre les groupes de légumineuses à inoculation croisée et les groupes correspondants de microbes à agglutination croisée, tandis qu'on a mis en évidence l'existence de différents groupes sérologiques dans chaque groupe d'inoculation. On a constaté de notables diversités, au point de vue du pouvoir contaminant et de l'activité fixatrice, entre les cultures provenant de différentes légumineuses d'un même groupe d'inoculation, ou de différentes plantes d'une même espèce, ou même de différents tubercules d'une même plante. On a démontré aussi, plusieurs fois, l'indépendance complète du pouvoir infectant des cultures, de leur aptitude fixatrice.

10. — L'inaptitude des germes tuberculigènes à assimiler l'azote élémentaire dans leur cultures pures a été confirmée d'une façon irréfutable; maintenant le mécanisme de la fixation de l'azote dans la symbiose Légumineuses – *Bac. radicicola*, reste encore complétement obscur.

11. — On a éxecuté plusieurs recherches au sujet de l'action des différents agents physiques et chimiques sur le *Bac. radicicola* dans ses cultures et dans son milieu naturel. On a démontré la présence d'un principe lytique transmissible, dans les tubercules des légumineuses. De nouvelles preuves ont été données de l'action fertilisante de la symbiose Légumineuses – *Bac. radicicola*.

12. — Les méthodes employées jusqu'ici pour la recherche et la détermination du pouvoir azoto-fixateur du sol, basées sur l'évaluation du gain en azote decelable dans les solutions sucrées ensemencées avec de la terre, ou dans la terre même, enrichie de matériaux énergétiques, présentent de très graves défauts et donnent des résultats tout à fait trompeurs. D'ailleurs, la simple mise en évidence du nombre et de l'activité des Azotobacters, quoique obtenue par des méthodes exactes, ne semble non plus correspondre au but.

13. — Nous ne savons rien de bien précis sur la portée réelle de l'activité des microbes fixateurs non symbiotiques dans le sol. Très probablement on doit éliminer l'idée de l'intervention des espèces qui sont incapables de se développer dans des milieux de culture dépourvus d'azote ou en contenant très peu, et qui vivent dans le sol certainement aux dépens de l'azote combiné. De même, les assertions relatives à une action fixatrice importante de la part des Clostridiums dans les terrains acides ou dans tous les terrains en général, ne semblent pas bien fondées. En consèquence, l'opinion prédominante aujourd'hui est que le phènomene de la fixation de l'azote dans le sol doit être considéré essentiellement comme le résultat de l'activité des *Azotobacter*.

14. — Mais on peut aussi mettre en doute cette grande activité des *Azotobacter* dans le sol, à cause:

a) de la difficulté de démontrer que ces microbes rencontrent dans le sol des matériaux hydrocarbonés assimilables en des proportions suffisantes pour leurs besoins énergétiques;

b) de l'action empêchante des différents composés azotés qui se trouvent normalement dans le sol (ammoniaque, nitrates, amino-acides, etc.) vis-à-vis de l'activité fixatrice des *Azotobacter*;

c) de la pauvreté numérique des *Azotobacter* dans le sol, pauvreté qui n'est pas suffisamment compensée par une éventuelle activité prolongée.

15. — On ne doit pas exclure la possibilité d'une fixation de l'azote élémentaire dans le sol, comme suite de processus physico-chimiques. Il serait très utile d'instituer de nouvelles recherches à ce propos, en tâchant de coordonner l'étude de ces processus avec celle des éventuelles activités microbiennes concomitantes.

16. — Les propositions, même récemment répétées, d'inoculer le terrain au moyen des Azotobacters ou d'autres fixateurs non symbiotiques, n'ont eu aucune suite et aucune application pratique utile. Au contraire, l'emploi des Azotobacters a été très avantageux dans quelques méthodes de laboratoire, comme un index très sensible et exact du manque éventuel de la chaux, des phosphates et peut-être aussi d'autres éléments minéraux dans les terrains agricoles.

17. — Il faut absolument mettre en garde la bonne foi des agriculteurs, contre les très nombreuses préparations microbiologiques pseudo-fertilisantes, pour les légumineuses ou pour les plantes en général. Quelques unes d'entre elles sont constituées par des microbes azoto-fixateurs (ou supposés tels) non symbiotiques, et sont toujours inefficaces. D'autres contiennent des microbes tuberculigènes; mais très souvent ces microbes sont associés à des microbes de contamination, ou leur vitalité est très

relentie ou tout à fait absente, ou, enfin, ils ne sont pas appropriés aux légumineuses à inoculer.

18. — Les progrès récents qu'on a fait dans l'étude du *Bac. radicicola* confirment la grande délicatesse des procédés de préparation des cultures à utiliser pour l'inoculation des légumineuses et la difficulté d'un contrôle sûr, des produits du commerce. Les résultats de l'inoculation sont strictement liés aux garanties de pureté, d'activité et d'adaptation à chaque légumineuse, que les produits microbiologiques utilisés peuvent offrir. Ces garanties existent seulement lorsque la préparation de ces produits est confiée à des institutions scientifiques compétentes. Ainsi, aux États Unis d'Amérique, les cultures distribuées par les Stations expérimentales agraires correspondent au but de la manière la plus satisfaisante. Il faut espérer qu'il en sera bientôt de même en Italie, où, du fait de l'admirable impulsion donnée actuellement aux assainissements agricoles, le problème de la production et d'une large distribution des cultures tuberculigènes pures et actives est sans doute de l'actualité la plus frappante.

X. — Bibliographie.

(1) *Omeliansky*, Monogr. Russ. Acad. Sci., Petrograd, 1923.
(2) *Müller* e *Stapp*, Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstw., 1925 (XIV).
(3) *De' Rossi*, « Microbiologia agraria e tecnica », Torino, 1927. Cfr. il Cap. XXIV da pag. 839 a pag. 875 (i relativi fascicoli sono stati pubblicati alla fine del 1922 e al principio del 1923); e i Cap. XXIX, XXX, XXXI in molti luoghi.
(4) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 817, 1063.
(5) *Braun* e *Goldschmidt*, Centralbl. f. Bakteriol., I, 1927 (CI).
(6) *Löhnis* M. F., Soil Science, 1930 (XXIX).
(7) *Wilson, Hopkins, Fred*, Archiv f. Mikrobiologie, 1932 (III).
(8) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 850.
(9) *Bristol* e *Page*, Ann. of Appl. Biology, 1923 (X).
(10) *Hopkins*, Soil Science, 1929 (XXVIII).
(11) *Davisson* e *Parker*, Journ. Ind. and Enginn. Chem., 1919 (XI).
(12) *Meyer H.*, « Lehrbuch der Organ. Chem. Methodik », I, pag. 242.
(13) *Löhnis F.*, Centralbl. f. Bakter., II, 1904 (XII), 1905 (XIV).
(14) *Fischer*, Landwirtsch. Jahrbücher, 1909 (XXXVIII).
(15) *De' Rossi*, Bollett. della Sez. Ital. della Soc. Intern. di Microbiologia, 1933 (5ª nota)
(16) *Greaves* e *Carter*, Soil Science, 1928 (XXVI).
(17) *Emerson*, Soil Science, 1917 (III).
(18) *Winogradsky*, Bull. de l'Inst. Pasteur, 1928.
(19) *Winogradsky*, Annales de l'Inst. Pasteur, 1926.
(20) *De' Rossi*, Bollett. della Sez. Ital. della Soc. Intern. di Microbiologia, 1932 (1ª nota).
(21) *Beijerinck* e *van Delden*, Centralbl. f. Bakteriol., 1902 (IX).
(22) *Löhnis F.*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1905 (XIV).
(23) *Fischer*, Ber. Deutsch. Botan. Gesellsch., 1918 (XXXV).
(24) *Skinner*, Soil Science, 1928 (XXV).
(25) *Selim*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1931 (LXXXIII).
(26) *Löhnis* e *Pillai*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1907 (XIX).
(27) *Bondorff*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1922 (XXXV).
(28) *Riccardo*, Ann. della R. Scuola Sup. di Agraria di Portici, 1923 (XVIII), 1924 (XX).
(29) *Beijerinck*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1925 (LXIII).
(30) *Schröder*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1932 (LXXXV).
(31) *Velich*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1930 (LXXX).
(32) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. de l'Acad. des Sciences, 1922 (CLXXV).

([33]) *Winogradsky*, Annales de l'Inst. Pasteur, 1928.
([34]) *Schober*, Jahrb. f. Wissensch. Botanik, 1930 (LXXII).
([35]) *De' Rossi*, « Microbiologia », § 170.
([36]) *Moore* e *Webster*, Proceed. Roy. Soc. B., 1920 (XCI), 1921 (XCII).
([37]) *Drewes*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXVI).
([38]) *Allison* e *Morris*, Science, 1930.
([39]) *Rayner*, Botanical Gazette, 1922 (LXXIII).
([40]) *Melin*, Rif. in Centralbl. f. Bakteriol., II, 1926 (LXVI).
([41]) *Clausen*, Centralbl. f. Bakteriol. II, 1931 (LXXXIV).
([42]) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 850.
([43]) *Skinner*, Soil Science, 1929 (XXVII).
([44]) *Beijerinck*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1901 (VII).
([45]) *Winogradsky*, Annales de l'Institut Pasteur, 1925, 1926, 1928, 1932.
([46]) *Castelli*, Boll. della Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microbiologia, 1931.
([47]) *Löhnis* e *Smith*, Journ. Agricult. Research, 1923 (XXIII).
([48]) *Jones*, Science, 1913 (XXXVIII); Centralbl. f. Bakteriol., II, 1915 (XLII); Journ. of Bacteriology, 1920 (IV).
([49]) *Bonazzi*, Journ. Agricult. Research., 1915 (IV).
([50]) *Schmidt*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1920 (L).
([51]) *Issatschenko* e *Giljarowski*, Idem., 1922 (LVII).
([52]) *Stapp*, Idem., 1924 (XLI).
([53]) *Löhnis* e *Smith*, Journ. Agricult. Research., 1916 (VI), 1923 (XXIII); Memoirs of the National Acad. of Science, Washington, 1921 (XVI).
([54]) *Niemayer*, Botan. Archiv., 1924 (VII).
([55]) *Wilk* e *Ziegenspeck*, Idem., 1930 (XXX).
([56]) *Petschenko*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1930 (LXXX).
([57]) *Beauverie*, Rif. in Bull. de l'Inst. Pasteur, 1927.
([58]) *De Regel*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1932 (LXXXVI).
([59]) *Stapp*, Idem., 1924 (LXI).
([60]) *Sanborn* e *Hamilton*, Journ. of Bacteriology, 1929 (XVIII).
([1]) *Hamilton*, Idem., 1931 (XXII).
([62]) *Rippel* e *Ludwig*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1925 (LXIV).
([63]) *Hunter*, Journ. Agricult. Research., 1923 (XXIV).
([64]) *Bradley* e *Fuller*, Soil Science, 1930 (XXX).
([65]) *Winogradsky*, Annales de l'Inst. Pasteur, 1926.
([66]) *Gerlach* e *Vogel*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1902 (IX).
([67]) *Heinze*, Idem., 1903 (X), 1904 (XII).
([68]) *Lipman*, New Jersey Agric. Exp. Sta., Ann. Rpt., 1904 (XXV), 1905 (XXVI).
([69]) *Stapp*, I° Congr. internazionale per la Scienza del suolo, Washington, 1927 (III).
([70]) *Blom*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1931 (LXXXIV).
([71]) *Aso* e *Loew*, Idem., 1909 (XXII).
([72]) *Gautier* e *Drouin*, Compt. Rend. Acad. des Sciences, 1888 (CVI), 1891 (CXIII).
([73]) *Burk.*, Journ. General Physiology, 1927 (X).
([74]) *Bonnema*, Chemiker Zeitung, 1903 (XXVII).
([75]) *Sestini*, Studi e ricerche del Laboratorio di Chimica Agraria della R. Univ. di Pisa, 1904-05 (XX).
([76]) *Kellermann* e *Smith*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1914 (XL).
([77]) *Kostytschew*, *Ryskaltschuk*, *Schwezowa*, Ztschr. physiol. Chemie, 1926 (CLIV).
([78]) *Winogradsky*, Compt. Rend. Acad. des Sciences, 1894 (CXVIII).
([79]) *Stoklasa*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1908 (XXI).
([80]) *Omelianski* e *Sieber*, Ztschr. physiol. Chemie, 1913 (LXXXVIII).
([81]) *Wieland*, Berichte Deut. Chem. Gesellsch., 1922 (LV).
([82]) *Meyerhof* e *Burk*, Ztschr. physiol. Chemie, 1928 (CXXXIX).
([83]) *Winogradsky*, Compt. Rend. Acad. des Sciences, 1930 (CXC).
([84]) *Lipman* e *Teakle*, Soil Science, 1925 (XIX).
([85]) *Pringsheim*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1908 (XX), 1909 (XXIII).
([86]) *Tuorila*, Idem., 1928 (LXXV).
([87]) *Skinner*, Journ. of Bacteriology, 1930 (XIX).
([88]) *Sanborn*, Idem., 1926 (XII), 1927 (XIV).
([89]) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. d. la Soc. de Biologie, 1924 (XXI).
([90]) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. d. l'Acad. des Sciences, 1926 (CLXXXII, CLXXXIII).
([91]) *Lipman* e *Teakle*, Journ. of gener. Physiology, 1925 (VII).

([92]) *Schroeder*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1932 (LXXXV).
([93]) *Cengia Sambo*, Atti della Soc. Tosc. Scienze Naturali, 1923 (LXII), 1925 (LXIV); Bull. Sez. Ital. della Soc. internaz. di Microbiologia, 1931.
([94]) *Winogradow*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1927 (LXXII).
([95]) *De' Rossi*, Osservazioni non ancora pubblicate.
([96]) *Nasir*, Ann. Appl. Biology, 1923 (X).
([97]) *Cutler* e *Bal*, Idem., 1926 (XIII).
([98]) *Hirai* e *Hino*, Journ. of Agricult. Chemistry, 1926 (II).
([99]) *Winogradowa* e *Gurfein*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXIV).
([100]) *Lipman*, New Jersey Agr. Exp. Sta., Ann. Rpt., 1903 (XXIV).
([101]) *Pringsheim*, Centralbl. f. Bakteriol, 1914 (XL).
([102]) *Hanzawa*, Idem., 1914 (XLI).
([103]) *Krainsky*, Experim. Station Record, 1914 (XXXI).
([104]) *Prazmowski*, Bull. Acad. Sci. Cracovie, Classe des Sci. Math. et Nat., 1912.
([105]) *Hills*, Journ. Agric. Research., 1918 (XII).
([106]) *Bonazzi*, Journ. of Bacteriology, 1921; IV Congr. Internaz. della Scienza del Suolo, Roma, 1924 (III B).
([107]) *Zoond*, Brit. Journ. Biology, 1926 (VI).
([108]) *Burk* e *Lineweaver*, Journ. of Bacteriology, 1930 (XIX).
([109]) *Fuller* e *Rettger*, Soil Science, 1931 (XXXI).
([110]) *Curie*, Idem., 1931 (XXXII).
([111]) *Krishna*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXVI).
([112]) *Gainey* e *Batchelor*, Science, 1922 (LVI).
([113]) *Gainey*, Journ. Agricult. Research, 1923 (XXIV); Soil Science, 1925 (XX).
([114]) *Omeliansky*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1926 (CLXXXIII).
([115]) *Niklas* e *Poschenrieder*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1926 (LXVI), 1927 (LXXI).
([116]) *Gibbs* e *Batchelor*, Soil Science, 1927 (XXIV).
([117]) *Demoussy*, Ann. Sci. Agronom., 1929 (XLVI).
([118]) *Löhnis* e *Pillai*, Centralbl. f. Bakteriol., 1908 (XX).
([119]) *Krzemieniewski*, Idem., 1907 (XVIII).
([120]) *Maassen* e *Behn*, Arb. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch., 1924.
([121]) *Kiessling*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([122]) *Gräf*, Idem., 1930 (LXXXII).
([123]) *Voicu*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1923 (CLXXVI).
([124]) *Birsch Hirschfeld*, Archiv für Mikrobiologie, 1932 (III).
([125]) *Dianowa* e *Woroschilowa*, Rif. in Bull. de l'Inst. Pasteur, 1928.
([126]) *Burk* e *Lieneweaver*, Archiv f. Mikrobiologie, 1931 (II).
([127]) *Schröder*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1932 (LXXXV).
([128]) *Bihler*, Dissert. Techn. Hochschule München, 1927.
([129]) *Butenschön*, Idem.
([130]) *Kayser* e *Delaval*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1924 (CLXXIX), 1925 (CLXXXI).
([131]) *Riccardo*, Ann. d. R. Scuola Sup. di Agraria di Portici, 1924, 1928.
([132]) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1926 (CLXXXII).
([133]) *Bartels*, Archiv f. Mikrobiologie, 1930 (I).
([134]) *Omelianski* e *Salunskow*, Arch. des Sciences Biologiques, St. Petersbourg, 1915.
([135]) *Hutchinson*, Report Agric. Res. Inst. and Coll. Pusa (India), 1911-12.
([136]) *Groenewege*, Arch. Suikerind., 1913 (XXI).
([137]) *Greaves*, Soil Science, 1918 (VI).
([138]) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 1042.
([139]) *Christensen*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1907 (XVII).
([140]) *Ziemiecka*, Rocznikow Nauk Rolnicz., 1923 (X).
([141]) *Burri*, Schweiz. Ztschr. Forstwesen, 1904 (LV).
([142]) *Gainey*, Journ. of Agricult. Research., 1923 (XXIV).
([143]) *Yamagata*, Journ. of the Agric. Chemic. Society of Japan, 1924.
([144]) *Brenner*, Agrogeol. Meddl., Geol. Komm. Finland, 1924 (N. 20).
([145]) *Weiss* e *Bornebusch*, Boll. di informaz. agrarie, 1915.
([146]) *Düggeli*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1926 (LXVIII).
([147]) *Smith*, Journ. of Bacteriology, 1932 (XXIII).
([148]) *Düggeli*, Schweiz. Ztschr. f. Forstwesen., 1923 (LXXIV).
([149]) *Feher*, Archiv f. Mikrobiologie, 1930 (I).
([150]) *Rossi*, Annali d'Igiene, 1932.
([151]) *Riccardo*, Ann. d. R. Ist. Sup. Agrario di Portici, 1928 (III).
([152]) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. Acad. d. Sciences, 1921.

(153) *Arnaudi* e *Jarach*, Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. di Microbiol., 1930.
(154) *De' Rossi*, Idem., 1932 (Nota 2ª).
(155) *Richter*, Wissensch. Annalen d. Univ. von Saratow., 1925.
(156) *Schulgina*, Bull. of the Inst. of Agricult. Microbiology, S.I.E.A., 1927.
(157) *Chodzew*, Ber. d. Inst. f. Land- u. Fortswirtsch. in Kazan ,1928.
(158) *Salensky* e *Kucharkowa*, Journ. f. Wissensch. Landwirtsch., 1929.
(159) *Dianowa* e *Woroschilowa*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1931 (LXXXIV).
(160) *Winogradsky*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1893 (CXVI), 1894 (CXVIII); Arch. Sc. Biolog. (St. Petersbourg), 1895 (III); Centralbl. f. Bakteriol., II, 1902 (IX).
(161) *Bredemann*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1908 (XXII), 1909 (XXIII).
(162) *Omeliansky*, Arch. Sc. Biolog. (St. Petersbourg), 1915 (XVIII), 1916 (XIX).
(163) *Pringsheim*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1906 (XVI), 1908 (XX, XXI), 1909 (XXIII e XXIV), 1913 (XXXVI), 1914 (XL).
(164) *Mc Coy*, *Higby*, *Fred*, Idem., 1928 (LXXVI).
(165) *Cunningham* e *Jenkins*, Journ. Agricult. Science, 1927 (XVII).
(166) *Dorner*, Landw. Jahrb. Schweiz., 1924 (XXXVIII).
(167) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. Acad. Sciences, 1925 (CLXXXI).
(168) *Winogradsky*, Annales Inst. Pasteur, 1925.
(169) *Wendel*, Beitr. Allgem. Botan., 1918 (I).
(170) *Spratt*, Annals of Botany, 1919 (XXXIII).
(171) *Brenchley* e *Thornton*, Proc. R. Society of London, B., 1925 (XCVIII).
(172) *Milovidov*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1926 (LXVIII); Rev. gen. de Botanique, 1928 (XL).
(173) *Dangeard*, Le Botaniste, 1926.
(174) *Mc Coy*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
(175) *Bazarewski*, Idem., 1928 (LXXIII).
(176) *Pfeiffer*, Idem., 1928 (LXXIII).
(177) *Wright*, Soil Science, 1925 (XX).
(178) *Fred*, *Peterson*, *Davenport*, Journ. Biolog. Chemistry, 1920 (XLII).
(179) *Allison*, Journ. Agricult. Research., 1927 (XXXV).
(180) *Wilson*, Journ. Americ. Soc. Agronom., 1926 (XVIII); Soil Science, 1930 (XXX).
(181) *Waksman*, « Principles of Soil Microbiology », Baltimore, 1927, pag. 129.
(182) *Greig-Smith*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1912 (XXXIV).
(183) *De' Rossi*, Annali d'Igiene, 1906; Annali di Botanica, 1909.
(184) *Milovidov*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXIII).
(185) *Hofer* e *Baldwin*, Journ. of Bacteriology, 1932 (XXIII).
(186) *Almon* e *Baldwin*, Idem., 1932 (XXIII).
(187) *Löhnis* e *Hansen*, Journ. Agricult. Research., 1921 (XX).
(188) *Feher* e *Bokor*, Planta, 1926 (II).
(189) *Israilsky*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
(190) *Bewley* e *Hutchinson*, Journ. Agricult. Science, 1920 (X).
(191) *Thornton* e *Gangulee*, Proceed. R. Soc. London, B., 1926 (XCIX).
(192) *Kas*, Rif. in Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXVI).
(193) *Schönberg*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
(194) *Gibson*, Journ. Agricult. Science, 1928 (XVIII).
(195) *Winogradsky*, Bull. de l'Inst. Pasteur, 1929.
(196) *Beijerinck*, Botanische Zeitung, 1888, 1890.
(197) *Hiltner* e *Störmer*, Arb. aus d. Biolog. Abth. f. Land- u. Forstw. a. K. Gesundheitsamte, 1903 (III).
(198) *Frank*, Landwirtsch. Jahrb., 1890 (XIX).
(199) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 867.
(200) *Burril* e *Hansen*, Illinois Agr. Exp. Sta., Bull. 202, 1917.
(201) *Kirschner*, Cohn's Beitr. zur Biologie der Pflanzen, 1895 (VII).
(202) *Shunk*, Journ. of Bacteriology, 1921, (VI).
(203) *Wilson*, Cornell Agr. Exp. Sta., Bull., 386, 1917.
(204) *Baldwin* e *Fred*, Soil Science, 1927 (XXIV).
(205) *Schönberg*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
(206) *Walker* e *Brown*, Soil Science, 1930 (XXX).
(207) *Bergey*, « Manual of Determinative Bacteriology », II Ed., Baltimore, 1925.
(208) *Baldwin* e *Fred*, Journ. of Bacteriology, 1929 (XVII).
(209) *Eckhardt*, *Baldwin* e *Fred*, Idem., 1931, (XXI).
(210) *Lehmann* e *Neumann*, « Bakteriologische Diagnostik », VII Ed., 1927.
(211) *Maassen* e *Müller*, Mitteil. a. d. K. Biolog. Anst. f. Land- u. Förstw., 1906.

(212) *Simon*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1914 (XLI).
(213) *German* e *Didlake*, Kentucky Agr. Exp. Sta., 1914, Bull. 184.
(214) *Hansen*, Scientific Agriculture, 1921 (I).
(215) *Walker*, Jowa Agr. Exp. Sta., Res. Bull. 113 (1928).
(216) *Zipfel*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1912 (XXXII).
(217) *Vogel* e *Zipfel*, Idem., 1921, (LIV).
(218) *Klimmer* e *Krüger*, Idem., 1914 (XL).
(219) *Krüger*, Idem., 1917 (XLVII).
(220) *Klimmer*, Idem., 1922, (LV).
(221) *Feher* e *Bokor*, Planta, 1926 (II).
(222) *Stevens*, Journ. Infect. Diseases, 1923 (XXXIII).
(223) *Aso* e *Okawara*, Actes IV Congr. Intern. de Pedologie, Rome, 1924 (III).
(224) *Israilsky*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
(225) *Wright*, Journ. of Bacteriology, 1930 (XIX).
(226) *Bialosuknia* e *Klott*, Ber. u. Gesammte Physiol., 1924 (XXIX).
(227) *Jimbo*, Botan. Magaz. Tokyo, 1930 (XLIV).
(228) *Helz*, *Baldwin*, *Fred*, Journ. Agric. Research., 1927 (XXXV).
(229) *Richmond*, Journ. Americ. Soc. Agronom., 1926 (XVIII).
(230) *Leonard*, Soil Science, 1923 (XV).
(231) *Hansen* e *Tanner*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1931 (LXXXV).
(232) *Sears* e *Carrol*, Soil Science, 1927 (XXIV).
(233) *Baldwin* e *Hofer*, Journ. of Bacteriology, 1932 (XXIII).
(234) *Lewis* e *Nicholson*, Oklaoma Agr. Exp. Sta. Bull. 68, 1905.
(235) *Hopkins*, Illinois Agr. Exp. Sta. Bull. 94, 1912.
(236) *Voorhees*, Journ. Amer. Soc. Agronom., 1915 (VII).
(237) *Morse*, Idem., 1915 (VII).
(238) *Fred* e *Bryan*, Soil Science, 1922 (XIV).
(239) *Perkins*, Journ. Agricult. Research., 1930.
(240) *Wright*, Soil Science, 1925 (XX).
(241) *Stevens*, Idem., 1925 (XX).
(242) *Whiting*, *Fred*, *Helz*, Idem., 1926 (XXIII).
(243) *Sears* e *Clark*, Idem., 1930 (XXX).
(244) *Nobbe* e *Hiltner*, Landwirtsch. Versuchstat., 1893 (XLII); Centralbl. f. Bakteriol., II, 1900 (VI).
(245) *Hiltner* e *Störmer*, Arb. a. d. Biol. Abth. f. Land- u. Förstw. a. K. Gesundheitsamte, 1900 (I).
(246) *Moore*, U. S. Dept. Agric. Bur. of Plant Ind. Bull. 71, 1905.
(247) *Löhnis M.*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1930 (LXXX).
(248) *Dunham* e *Baldwin*, Soil Science, 1931 (XXXII).
(249) *Hiltner*, « Die Bindung vom freiem Stickstoff ecc. », in *Lafar*, « Handb. d. landwirtschaftl. Bakteriologie », III, § 9.
(250) *Wunschik*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1925 (LXIV).
(251) *Stapp*, Angew. Botan., 1929 (XI).
(252) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 867.
(253) *De' Rossi*, Annali di Botanica, 1909 (VII).
(254) *Greig Smith*, Centralbl. f. Bakteriol. II, 1912 (XXXIV).
(255) *Spratt*, Annals of Botany (London), 1912 (XXVI).
(256) *Olaru*, Compt. Rendus Acad. Sciences, 1915 (CLX).
(257) *Hills*, Journ. Agricult. Research, 1918 (XII).
(258) *Joshi*, India Dpt. Agric. Mem., Bacter. Ser., I, 1920.
(259) *Singh*, Soil Science, 1920 (IX).
(260) *Hutchinson*, Agric. Res. Inst. Pusa, Sci. Rpts., 1922-23, 1923-24.
(261) *Fred*, *Whiting*, *Hastings*, Wisconsin Agr. Exp. Sta., Res. Bull. 72, 1926.
(262) *Halversen*, Jowa State Coll. Journ. Sci., 1927 (I).
(263) *Barthel*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1927 (LXIX).
(264) *Stiehr*, Idem., 1927 (LXXI).
(265) *Skinner*, Soil Science, 1928 (XXV).
(266) *Hopkins*, Idem., 1929 (XXVIII).
(267) *Allison*, Journ. Agricult. Research., 1929 (XXXIX).
(268) *Burk*, Journ. Phys. Chem., 1930 (XXXIV).
(269) *Löhnis M.*, Soil Science, 1930 (XXIX).
(270) *Pohlmann*, Journ. Americ. Soc. Agron., 1931 (XXIII).
(271) *Wilson*, *Hopkins*, *Fred*, Archiv f. Mikrobiologie, 1932 (III).

([272]) *Wilson, Hopkins, Fred,* Soil Science, 1931 (XXXII).
([273]) *Mc Coy,* Proceed. R. Soc. of London, B., 1932 (CX).
([274]) *Baldwin, Fred, Hastings,* Botan. Gazette, 1927 (LXXXIII).
([275]) *Thornton,* Proceed. R. Soc. of London, B., 1929 (CIV).
([276]) *Kellermann* e *Beckwith,* Science, 1906.
([277]) *Chester,* Delaware Agr. Exp. Sta., Bull. 78, 1907.
([278]) *Prucha,* N. York Cornell Agr. Exp. Sta. Mem. 5, 1915.
([279]) *Edwards,* Abstracts of Bacteriology, 1923 (VII).
([280]) *Temple,* Georgia Agr. Exp. Sta. Bull. 120, 1916.
([281]) *Fellers,* Soil Science, 1919 (VII).
([282]) *Richmond,* Journ. Amer. Soc. Agronom., 1926 (XVIII).
([283]) *Alicante,* Soil Science, 1926 (XXI).
([284]) *Lochhead,* Sci. Agron., 1927 (VII).
([285]) *Porges,* Soil Science, 1931 (XXXII).
([286]) *Russell* e *Morrison,* Wisconsin Agr. Exp. Sta. Bull. 319, 1920.
([287]) *Albrecht,* Montana Agr. Exp. Sta. Bull. 236, 1926.
([288]) *Vandecaveye,* Soil Science, 1927 (XXIII).
([289]) *Albrecht* e *Turk,* Missouri Agr. Exp. Sta. Re. Bull. 130, 1930.
([290]) *Fred* e *Davenport,* Journ. Agric. Research., 1918 (XIV).
([291]) *Bewley* e *Hutchinson,* Journ. Agric. Science, 1920 (X).
([292]) *Bryan,* Soil Science, 1922 (XIII), 1923 (XV).
([293]) *Snieszko,* Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([294]) *Virtanen,* Biochem. Ztschr., 1928 (CXCIII).
([295]) *Karraker,* Soil Science, 1927 (XXIV).
([296]) *Albrecht* e *Davis,* Idem., 1929 (XXVIII).
([297]) *Doolas,* Idem., 1930 (XXX).
([298]) *Scaulan,* Idem., 1928 (XXV).
([299]) *Allison,* Journ. Agric. Research., 1927 (XXXV).
([300]) *Leonard,* Journ. of Bacteriology, 1929 (XVII).
([301]) *Pohlman,* Soil Science, 1931 (XXXI).
([302]) *Lipman* e *Blair,* Idem., 1916 (I).
([303]) *Wilson,* New York Cornell Agr. Exp. Sta., Bull. 386, 1917.
([304]) *Strowd,* Soil Science, 1920 (X).
([305]) *Albrecht,* Idem., 1920 (IX).
([306]) *Weber,* Centralbl. f. Bakteriol., II, 1930 (LXXXII).
([307]) *Perkins,* Soil Science, 1924 (XVII).
([308]) *Brenchley* e *Thornton,* Proceed. R. Soc. London, B., 1925 (XCVIII).
([309]) *Loew* e *Aso,* Tokyo Coll. of Agricult., Bull. 7, 1906-08.
([310]) *Gerretsen, Grijns, Sack, Söhngen,* Centralbl. f. Bakteriol., II, 1923 (LX).
([311]) *Grijns,* Idem., 1927 (LXXI).
([312]) *Israilsky,* Idem., 1929 (LXXIX).
([313]) *Hitchner,* Journ. of Bacteriology, 1930 (XIX).
([314]) *Laird,* Archiv f. Mikrobiologie, 1932 (III).
([315]) *Weniger,* Centralbl. f. Bakteriol., II, 1923 (LVIII).
([316]) *Frazier* e *Fred,* Soil Science, 1922 (XIV).
([317]) *Hocquette,* Compt. Rend. Soc. de Biologie, 1929 (C, CI).
([318]) *Burke* e *Hohl,* Soil Science, 1930 (XXX).
([319]) *Lipman* e *Blair,* Idem., 1916 (I).
([320]) *Brown,* Jowa Agr. Exp. Sta., Circ. 43, 1918.
([321]) *Fred* e *Graul,* Soil Science, 1919 (VII).
([322]) *Arny* e *Thatcher,* Journ. Americ. Soc. Agron., 1917 (IX).
([323]) *Albrecht,* Soil Science, 1920 (IX).
([324]) *Fred,* Idem., 1921 (XI).
([325]) *Brown* e *Stallings,* Idem., 1921 (XII).
([326]) *Boekhout,* Pensilv. State Coll. Ann. Rpt., 1888.
([327]) *Nobbe, Schmid, Hiltner, Hotter,* Landw. Versuchsst., 1891 (XXXIX).
([328]) *Naudin,* Journ. Agric. Pratique, 1894 (LVIII).
([329]) *Harrison* e *Barlow,* Proceed. and Trans. R. Soc. Canada, 1906 (XII).
([330]) *Leonard,* Soil Science, 1925 (XX).
([331]) *Leonard* e *Reed,* Idem., 1930 (XXX).
([332]) *Beijerinck,* cit. da *Waksmann,* Idem., 1925 (XIX), pag. 252.
([333]) *Löhnis,* Idem., 1926 (XXII).
([334]) *Creuzburg,* Landwirtsch. Jahrb., 1928 (LXVIII).

([335]) *Starkey*, Soil Science, 1929 (XXVII).
([336]) *Greaves*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1914 (XLI).
([337]) *Gräf*, Idem, 1930 (LXXXII).
([338]) *Perotti*, Rend. Accad. Lincei, 1921 (II).
([339]) *Poschenrieder*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([340]) *Beijerinck*, citato da *Gräf* ([337]).
([341]) *Khalil*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([342]) *Lebedjantzew*, Soil Science, 1924 (XVIII).
([343]) *Brown*, Jowa Agr. Exp. Sta. Res., Bull. 25, 1915; Journ. Agricult. Res., 1916 (V).
([344]) *Burgess*, Soil Science, 1918 (VI).
([345]) *Gwenn*, *Kuhlman* e *Kern*, Pensilv. Agr. Exp. Sta. Ann. Rpt., 1916-17.
([346]) *Waksman* e *Karunakar*, Soil Science, 1924 (XVII).
([347]) *Maassen* e *Behn*, Arb. a. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Förstw., 1923 (XI).
([348]) *Dojarenko*, citato da *Wakmann* ([349]).
([349]) *Waksman*, Soil Science, 1925 (XIX).
([350]) *Krishna*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXVI).
([351]) *De' Rossi*, « Microbiologia », § 196.
([352]) *Brown*, Jowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 2, 5, 13; 1911-13.
([353]) *Christensen*, Soil Science, 1923 (XV).
([354]) *Berthelot*, Compt. Rendus Acad. des Sciences, 1885 (CI), 1892 (CXV).
([355]) *Beijerinck*, Centralbl. f. Bakteriologie, II, 1925 (LXIII).
([356]) *Winogradsky*, Annales de l'Inst. Pasteur, 1932.
([357]) *De' Rossi*, Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microbiologia, 1932 (3ª Nota).
([358]) *De' Rossi*, Stazioni Sperim. Agrarie Ital., 1920 (LIII).
([359]) *Miquel*, Annales de Micrographie, 1889.
([360]) *von Freudenreich*, « Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft », 1906.
([361]) *Bochicchio*, Stazioni Sperim. Agrarie Ital., 1894.
([362]) *Esten* e *Mason*, Storrs Agric. Exp. Sta., Bull. 83, 1915.
([363]) *Percival* e *Mason*, Journ. Agric. Res., 1913 (V).
([364]) *Scheffler*, Landwirtsch. Jahrb., 1912.
([365]) *Tottingham*, Journ. of Industr. and Enginn. Chemistry, 1919 (VIII).
([366]) *Löhnis* e *Smith*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1915 (XLIII).
([367]) *Stoklasa*, Ztschr. f. d. Landwirtsch.-Versuchsw. Oesterr., 1911.
([368]) *De Cillis*, Stazioni Sperim. Agrarie Ital., 1902.
([369]) *Hiltner*, in *Lafar*, « Handb. der Techn. Mykologie », 2ª ed., Jena, 1904-07 (III).
([370]) *De' Rossi*, Bull. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microbiologia, 1933 (4ª Nota).
([371]) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 1065.
([372]) *De' Rossi*, Boll. Sez. Ital. della Soc. Internaz. di Microbiologia, 1933 (6ª Nota).
([373]) *Warmbold*, Landwirtsch. Jahrb., 1906 (XXXV); Centralbl. f. Bakteriol., II, 1907 (XX)
([374]) *De' Rossi*, « Microbiologia », pag. 1064.
([375]) *De' Rossi*, « Microbiologia », § 224.
([376]) *Kronberger*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1927 (LXX).
([377]) *Jones*, Scientif. Agricult., 1928 (I).
([378]) *Zucker*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1928 (LXXIII, LXXIV).
([379]) *Rossi*, Annali di Tecnica Agraria, 1929 (I).
([380]) *Edman* e *Brown*, Jowa Agr. Exp. Sta. Bull. 262, 1929.
([381]) *Emerson*, Idem., Res. Bull. 45, 1918.
([382]) *Makrinoff*, Soil Science, 1924 (XVII).
([383]) *Russell*, Journ. Bd. Agric. (London), 1917 (XXIV).
([384]) *Barthel*, Deut. Landw. Presse, 1920 (L).
([385]) *Ehrenberg*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1921, (LIII).
([386]) *Gainey*, Soil Science, 1925 (XX).
([387]) *Karpinskaya*, Rif. in Bull. Inst. Pasteur, 1931.
([388]) *Christensen*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1906-07 (XVII), 1907 (XIX), 1915 (XLIII); Soil Science, 1923 (XV); Internat. Mitt. Bodenk., 1923 (XIII), 1924 (XIV).
([389]) *Niklas*, *Poschenrieder*, *Czibulka*, Das Superphosphat., 1930.
([390]) *Niklewski*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1912 (XXXII).
([391]) *Stoklasa*, « Methoden zur biochemische Untersuchung des Bodens », in *Abderhalden*, « Handb. d. Biochem. Arb. Meth. », V, 1912.
([392]) *Truffaut* e *Bezssonoff*, Compt. Rend. Acad. des Sciences, 1928 (CLXXXVI).
([393]) *König* e *Chouchak*, cit. da *Holsjnski* ([394]).
([394]) *Holsjnski*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([395]) *Stöckli*, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1929 (XLIII).

([396]) *Ziemiecka*, Centralbl. f. Bakteriol., II, 1929 (LXXIX).
([397]) *Jones*, Journal of Bacteriology, 1932 (XXIII).
([398]) *Alway* e *Nees*, Minnesota Agr. Exp. Sta. Techn., Bull. 46, 1927.
([399]) *Fred, Whiting, Hastings*, Univ. of Wisconsin Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 72, 1926.
([400]) *Thornton*, Journ. Agricult. Science, 1929 (XIX).
([401]) *Nolte* e *Münzberg*, Mitt. d. Dtsch. Landw. Gesellsch., 1930.
([402]) *Vivenza*, Atti d. Soc. Ital. per il Progr. delle Scienze, XVI Riunione, 1928.

PEYRONEL B. — **Absence de mycorhizes chez les plantes insectivores et hémiparasites, et signification probable de la mycorhizie.**

(Communication présentée au IV[e] Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Malgré les nombreuses recherches à propos des mycorhizes, on est bien loin d'avoir résolu la question, de savoir si elles sont utiles aux plantes mycorhizées, ou bien si les champignons du type mycorhize doivent être considérés comme de simples parasites; les opinions à ce propos sont des plus opposées.

Toutefois, chez les Ericacées, même si l'on ne veut pas admettre avec M.[me] Rayner (3, 4, 5) qu'elles sont des plantes mycotrophiques obligées, il paraît qu'on ne peut plus douter que l'endophyte est utile à la plante-hôte, étant donné sa faculté bien établie de fixer l'azote de l'atmosphère. De même, pour un certain nombre de plantes forestières les recherches expérimentales de Melin (1) sont très probantes: elles visent à démontrer que, dans un terrain contenant de l'azote sous forme de composés organiques, ces plantes se développent mieux si elles sont associées à un champignon mycorrhizogène, que toutes seules.

Et c'est encore des recherches nouvelles seulement que nous pouvons attendre la solution du problème pour ce qui se rapporte aux autres types de mycorhizes soit endotrophiques, soit ectotrophiques. Tout de même, en attendant une démonstration expérimentale, que des difficultés techniques de toutes sortes nous feront attendre longtemps encore, il ne sera pas inutile de recueillir toutes les données que peuvent nous fournir des observations diligentes des conditions naturelles, d'autant plus qu'elles pourront aussi nous éclairer pour ce qui se rapporte au chemin à suivre dans les recherches expérimentales.

C'est pour cela que je ne crois pas inutile d'exposer ici les résultats de quelques recherches que j'ai fait dernièrement à propos de l'appareil radiculaire d'un certain nombre de plantes insectivores ou hémiparasites, dans le but de voir si elles possédaient ou non des mycorhizes. En effet, si les champignons mycorhizogènes étaient de simples parasites, bien que

spécialisés, ils devraient, à notre avis, pouvoir contaminer les racines, en général assez développées, de ces plantes, aussi facilement que celles d'autres plantes vivant dans les mêmes stations.

En ce qui concerne les plantes insectivores, Stahl (6) avait déjà observé qu'elles ne possédaient pas de mycorhizes: et moi-même j'ai confirmé ce fait pour ce qui se rapporte à *Drosera rotundifolia*. Dernièrement j'ai voulu renouveler mes observations, en les étendant aussi à *Pinguicula vulgaris*. J'ai choisi des individus de *Drosera* et de *Pinguicula* poussant dans des tourbières ou dans d'autres terrains humides, au milieu de plantes abondamment mycorhizées, telles la *Viola palustris*, la *Potentilla Tormentilla*, et différentes graminées, etc. Mais, quoique leurs racines fussent entourées d'un épais réseau de mycélium mycorhizogène, du type *Endogene* (ou phycomycétoïde), je n'ai jamais pu observer un seul indice d'infection.

Un groupe très intéressant à ce point de vue est celui des plantes hémiparasites: il comprend bon nombre d'espèces, tant annuelles que vivaces, vivant dans les conditions écologiques les plus différentes. Celles que j'ai étudiées ne sont pas nombreuses, savoir: *Euphrasia officinalis*, *E. minima*, *E. sp. Rhinanthus major*, *Melampyrun pratense*, *Odontites serotina* parmi les Scrofulariacées; *Thesium alpinum* parmi les Santalacées. Toutes ces plantes, exception faite pour l'*Odontites*, poussent dans les prés, dans les pâturages ou dans les bois de la zone montagneuse, à Riclaretto, dans les Vallées Vaudoises Piémontaises. *Odontites serotina* a été recueillie dans des champs de seigle, où, toutefois, le phycomycète mycorhizogène était assez abondant, soit sur le seigle même, soit sur d'autres graminées spontanées. Comme comparaison, j'ai ensuite exécuté des recherches sur un certain nombre de Scrofulariacées qui poussaient dans les mêmes stations que les précédentes; elles sont: *Veronica officinalis*, *V. Allionii*, *V. fruticulosa*, *V. Chamaedrys*, *V. urticifolia*, *Linaria vulgaris* (1), *Digitalis ambigua*. Or, tandis que dans toutes ces dernières espèces j'ai remarqué des mycorhizes typiques endotrophiques du type *Endogene*, ou type phyco-mycotoïde, je n'ai pu trouver dans aucune des hémiparasites la moindre trace d'infection mycorhizique. J'ai, au contraire, remarqué la présence, constante chez les oloautotrophes, fréquente chez les hémiparasites, d'un mycélium du type *Rhizoctonia*, plus ou moins développé: celui-ci, pourtant, ne doit pas être considéré, d'aucune façon, comme un mycorhizogène, mais comme un faible parasite. Chez les individus du type *Euphrasia*, qui poussaient dans les lieux humides, près des rigoles, les cellules épidermiques des racines étaient souvent infectées

---

(1) Dans cette espèce, aussi bien que dans « *Verbascum Thapsus* » j'avais signalé déjà (v. N. 2 l. c.) la présence de mycorhizes endotrophiques.

par une Chitridiacée un peu différente, à mon avis, de la très commune *Asterocystis radicis.*

Il serait bon d'étendre ces recherches et j'espère pouvoir le faire. La famille des Scrofulariacées, riche en espèces qui présentent tous les degrés de passage de l'autotrophie complète à l'hémiparasitisme le plus prononcé, sert très bien à ce but.

Les résultats que j'ai exposés plus haut ne sont point susceptibles d'interprétation équivoque. Toutefois, en les rapprochant de nos connaissances actuelles sur le rôle des mycorhizes chez les Ericacées et les plantes forestières dont j'ai parlé ci-dessus, et considérant d'ailleurs la distribution des plantes mycotrophiques, je crois que ces résultats constituent un nouvel appui à la théorie, suivant laquelle le phénomène de la mycorhizie devrait être connexe de celui de la nourriture azotée.

En effet, en considérant l'ensemble des recherches faites jusqu'ici, et en laissant de côté quelque cas particulier, tel que celui des plantes humicoles, dépourvues ou presque de chlorophylle, nous voyons que la mycorhizie acquiert son développement le plus grand dans les terrains pauvres en composés azotés solubles (nitrates et sels ammoniacaux) et riches, au contraire, en substance organique. Les plantes rustiques, les plantes infestant les terrains cultivés, les plantes cultivées, en général, sont celles chez qui les mycorhizes manquent ou font plus facilement défaut. Si l'on sème du blé dans un pré ou dans un pâturage (expérience que j'ai répétée plusieurs fois), son appareil radiculaire sera complètement envahi par l'endophyte mycorhizique phyco-mycétoïde. Par contre, si l'on sème le blé dans un champ abondamment traité par des engrais, par ex. avec du nitrate de soude ou de chaux, ses petites racines mycorhizées seront très rares. Il est vrai que — ainsi que je l'ai remarqué d'autre part — le morcellement du terrain et l'épaisseur moins grande des racines doivent contribuer à cette infection mycorhizique plus facile, mais non jusqu'à justifier complètement les différences qu'on a observées.

En résumé, en l'état actuel de nos connaissances, tout nous porte à penser, à mon avis, qu'en des conditions normales de milieu, les mycorhizes sont utiles aux phanérogames qui en sont pourvues. Par là, je ne veux pas exclure tout à fait que dans certains cas elles peuvent être nuisibles; de même, je ne suis pas éloigné de croire que pendant quelques périodes de son développement — p. ex. pendant la période de sa fructification — ou du développement de la racine avec le champignon, celui-ci prend de la plante-hôte plus qu'il ne lui donne. Mais c'est le bilan final de l'association que nous devons considérer et quant à celui-ci, je le répète, tout nous porte à croire qu'il est utile aux deux associées.

BIBLIOGRAPHIE (*)

1. *Melin E.*, « Untersuchungen über die Bedeutung der Baum-mykorrhiza ». Jena, 1925
2. *Peyronel B.*, « Prime ricerche sulle micorrize endotrofiche e sulla microflora radicicola normale delle Fanerogame ». Riv. di Biologia, 5-6, 1923-1924.
3. *Rayner M. C.*, « Obligate symbiosis in *Calluna vulgaris* ». Ann. of Botany, 29, 1915.
4. — « Nitrogen fixation in the Ericaceae ». Botan. Gazette, 73, 1922.
5. — « Mycorrhiza in the Ericaceae ». Trans. of Brit. Mycol. Soc., 8, 1922.
6. *Stahl E.*, « Der Sinn der Mycorrhizenbildung ». Jahrb. f. wiss. Bot., 34, 1900.

(*) Pour une bibliographie plus étendue sur la question, cfr.: *Rayner M. C.*, « Mycorrhiza », Wheldon a. Wesley, London, 1927; *Barton-Wright E. C.*, « Recent advances in Botany », Churchill, London, 1932.

CASTELLI T. – **Recherches microbiologiques sur les particules d'un même terrain cultivé avec du blé et fertilisé avec divers engrais.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Les procédés d'étude des microbes du terrain récemment introduits par Winogradsky et surtout leurs applications à la recherche des azotofixateurs aérobies et des dégradateurs de la cellulose, nous permettent désormais d'obtenir une évaluation suffisamment exacte de la fréquence et de l'activité de ces deux groupes intéressants de microrganismes dans le terrain agricole.

Il est donc très intéressant, avec l'aide de ces méthodes, de reprendre l'examen de tous les différents problèmes concernant les rapports entre les microrganismes et la fertilité du terrain, problème qu'on avait jusqu'à présent étudié avec des méthodes nécessairement très imparfaites. Un de ces problèmes est celui de l'influence que les engrais peuvent exercer sur le nombre total des microbes et sur différents groupes bactériens particulièrement intéressants.

Sans vouloir m'étendre ici longuement, je rappellerai que l'engrais de poudre d'os a même une augmentation du contenu microbien (Montanari) et que le nombre des schyzomycètes augmente sensiblement si l'on donne au terrain des phosphates minéraux (Waksman, Fred et Hart). Une action favorable des phosphates sur la nitrification a été observée par Fraps, Patterson, Scott, Mac Taggart, Wohltmann et d'autres, tandis qu'elle est démentie par Jensen. L'effet utile des phosphates sur le développement des azoto-bactéries est bien connu depuis longtemps et les dernières recherches de Winogradsky ne laissent plus aucun doute sur la question.

D'après les résultats de Hall, Millet, Gimingham et Waksman les re-

cherches ne sont pas très concluantes pour les engrais azotés minéraux: l'emploi prolongé, comme engrais, du sulfat d'ammoniaque amènerait une diminution de la quantité totale des microrganismes et une augmentation des eumycètes, et ceci à cause de la réaction acide donnée au terrain par l'usage prolongé de cet engrais. Les nitrates exerceraient une action positive sur le chiffre total des germes (Waksman), des ammonisants (Coleman), des dénitrifiants (Dueggeli). Winogradsky a constaté un effet négatif des nitrates sur le développement des azoto-bactéries, tandis que Colemann soutient que de petites quantités de nitrates exercent une action favorable sur les fixateurs de l'azote.

Quant aux engrais potassiques, on considère en général qu'ils exercent un effet favorable sur le développement des microrganismes (Engberding et Waksman) et aussi sur les fixateurs de l'azote (Heinze et Hittner).

Des effets utiles sur les différents groupes de microrganismes, exercés par les engrais calcaires, ont été constatés par toute une série de recherches (Engberding, Fischer, Miller, Hutchinson etc.); cet effet utile est particulièrement sensible pour les azoto-bactéries (Remy, Christensen, Brown, Bear et Winogradsky).

En ce qui concerne les engrais organiques et leurs effets sur les microbes, ils varient selon la différence de leur composition chimique, la nature du terrain et son acidité; c'est pourquoi des résultats souvent contradictoires dérivent du fait que l'on a expérimenté dans des conditions opposées.

***

Grâce à l'aimable permission de Mr. le Prof. A. Vivenza, que je remercie bien vivement, j'ai pu prendre en examen une série de 12 parcelles de 100 mq. chacune, faisant partie du Champ de culture des grains annexé à la Chaire d'Agronomie de l'Institut R. Sup. Agricole de Pérouse. De cette façon, j'ai pu étudier si au cours de huit mois le contenu microbien d'un même terrain cultivé avec du blé et traité par des engrais différents variait et de quelle façon. Le terrain était le terrain normal de la région, avec labour moyen et moyenne fertilité; la culture précédente avait été un pré de luzerne de trois ans; les travaux de préparation du terrain et de semailles ont été égaux pour tous les lots. Les lots du N.º 1 au N.º 6 (semés avec le blé de la variété Villa Glori) ont reçu à la semaille comme engrais base: perphosphate minéral 10 quintaux et sulfate ammoniacal 2 quintaux par hectare; le lot N.º 1 n'a rien reçu, tandis que ceux du N.º 2 au N.º 6 ont reçu en couche superficielle du nitrate de calcium à raison de 3 quintaux par hectare, distribué en plusieurs fois (le lot N.º 2, deux fois, le N.º 3 quatre fois, le N.º 4 six fois, le N.º 5 huit fois, le N.º 6 dix fois).

Les lots du N.º 7 au N.º 12 (semés avec du blé de la variété Mentana) ont reçu à la semaille, comme engrais base, 1 quintal de perphosphate mineral et 1 quintal de sulfate potassique par hectare; successivement tous les lots ont reçu en couche superficielle des engrais azotés au nitrate de calcium à raison de 3 quintaux par hectare, divisés en quatre fois; chaque lot a encore reçu (sauf le N.º 7) des arrosages avec différents types d'engrais à différentes reprises. Les arrosages ont été faits dans les mois de janvier, février, mars, avril; le lot N.º 8 a reçu la Végétaline (engrais complexe de fer-cuivre, manganèse-potassium-calcium-magnésium-phosphore et soufre); le N.º 9 du nitrate de potasse, le N.º 10 du chlorure de potasse, le N.º 11 du phosphate bi-ammoniacal, le N.º 12 le sulfate d'ammoniaque.

***

De novembre à juin 1932, j'ai procédé, mois par mois, à des analyses microbiologiques de ces lots. On prélevait chaque fois, de chaque lot, avec une cuillière métallique spéciale, dans différents points, environ 50 petits échantillons de terre, à une profondeur moyenne de 12 cm., pour un poids total de 2 à 3 Kg. On mettait la terre dans de petits sacs de papier parcheminé et on la portait tout de suite au laboratoire, où, étendue sur des feuilles de papier et laissée à l'air pendant 20 à 36 heures, selon le degré d'humidité, elle était ensuite passée dans un crible à mailles d'un millimètre.

Pour chaque échantillon, on déterminait le contenu en humidité, en séchant à 120º jusqu'à obtenir un poids constant: par conséquent, les résultats ont été toujours rapportés à 1 gramme de terre sèche.

Dans chaque échantillon, j'ai tâché de déterminer le nombre de germes (c'est-à-dire le « nombre total » des microrganismes), le nombre des azoto-bactéries, l'activité des microbes décomposants la cellulose.

Pour le dénombrement des microrganismes en général, j'ai adopté le système usuel des suspensions d'un poids de terre déterminé en eau stérilisée, en semant différents volumes de la suspension même dans un milieu nutritif approprié. On sait que plusieurs travailleurs ont proposé les terrains de culture les plus différents, mais on sait aussi que d'autres ont démontré comment, en dernière analyse, la gelée ordinaire de viande est toujours celle qui donne les meilleurs résultats. Ainsi Fischer conseille sa gélose à la décotion de terre; Brown la gélose synthétique; Temple la gélose à la peptone. Conn, qui s'est longuement occupé de la question, recommande ses deux terrains de culture: la gelée à l'infusion de terre et la gélose asparaginée; Loehnis la gélose et la gelée à l'infusion de terre; Perotti la gélose de tourbe etc.

J'ai eu aussi occasion de faire quelques recherches à ce propos, en

essayant la gélose et la gelée de viande et la gélose et la gelée albumine (Brown) et la gélose à l'infusion de terre (Fischer).

La gélose et la gelée de viande ont été préparées en mêlant 1,5% de gelose ou le 15% de colle de poisson à du bouillon commun (eau 1000, peptone 10, extrait Lab. Lenco 10, chlorure de sodium 5). La gélose et la gelée à l'albumine de Brown ont été préparées en mêlant au liquide suivant; eau 100, albumine 0,15, dextrose 10, sulfate de magnésie 0,2, phosphate bi-potassique 0,5 et traces de sulfate ferreux) à 15 de gélose ou à 120 de colle de poisson. La gélose à l'infusion de terre a été préparée d'après les indications de Fischer, soit: cuisson pendant 90' à l'autoclave, à une atmosphère de volumes égaux de terre et d'eau, avec 1‰ de carbonate de sodium; à la décoction on a ajouté 2‰ de phosphate bipotassique et 1,2% de gélose.

Les cultures ont été gardées à 18° pour celle en gelée, et à 28° pour celles en gélose: la période d'incubation a duré 12 jours.

D'après les données du Tableau suivant, on voit confirmée la grande supériorité de la gelée de viande:

	A. dec. terre	A. Alb.	G. Alb.	A. Viande	G. Viande
Terrain sans engrais et non cultivé	1.000.000	2.000.000	2.500.000	3.500.000	6.000.000
Terrain à pomme de terre.	3.000.000	6.000.000	3.500.000	9.000.000	11.000.000
Terrain à chicorée	450.000	200.000	600.000	700.000	2.500.000
Terrain à luzerne	1.500.000	2.000.000	5.000.000	5.500.000	20.000.000
Terrain à jard. fruitier ..	1.300.000	1.700.000	3.000.000	2.300.000	7.000.000

Ces résultats obtenus, j'ai eu recours, pour mes recherches, à l'emploi de la gelée de viande, préparée comme j'ai décrit plus haut et en maintenant les plaques en observation pour 12 jours. Pour chaque échantillon on portait sur quatre plaques, respectivement: 1, 1/2, 1/10, 1/20 de centimètre cube d'une suspension terreuse en eau stérile (1 : 5.000). Pour l'évaluation des azoto-bactéries j'ai exactement suivi la méthode de Winogradsky, en utilisant des boîtes de Petri de 20 cm. de diamètre, ensemencées avec gr. 0,2 de terre. Pour l'étude des germes qui attaquent la cellulose j'ai, de même, suivi les indications de Winogradsky en employant des plaques de silice nutritive et du papier à filtre type « Perfecte ».

Les résultats des numérations en général des microrganismes et de celles des azotobactéries sont réunis dans le Tableau ci-joint, où l'on trouve aussi les indications relatives au relevé des températures atmosphériques pour la période des expériences, à la nature des engrais et à la récolte de blé obtenu dans les différents lots.

Parcelle		Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avril	Mai	Juin	Moyenne des huit analyses	Récolte du blé (Kilogs) Total	Granella
	Températures moyenne ...	9,56	3,4	5,12	0,75	5,65	9,35	14,8	17,38			
	Températures maximum ..	18,6	14,1	16,0	12,0	16,7	19,6	27,2	29,1			
	Températures minimum ...	1,5	-6,8	-6,2	-8,0	4,4	0,6	4,7	8,0			
1	Microrganismes	1.300	1.200	600	1.800	1.800	2.500	3.500	3.500	2.026	62,0	17,3
	Azotobactéries	1,0	2,5	2,75	5,0	5,0	4,0	3,4	4,0	3,46		
	Engrais											
2	Microrganismes	600	1.020	800	2.000	2.400	8.500	7.500	2.750	3.247	78,5	21,1
	Azotobactéries	1,5	2,0	3,8	5,5	3,0	2,8	2,0	0,8	2,7		
	Engrais				NC	NC						
3	Microrganismes	1.100	1.500	900	2.700	2.280	2.500	5.000	2.500	2.300	73,5	20,15
	Azotobactéries	2,0	1,6	2,0	3,5	4,0	3,3	3,0	1,4	2,6		
	Engrais			NC	NC	NC	NC					
4	Microrganismes	1.100	1.500	800	1.200	3.600	6.000	5.500	3.000	2.840	97,0	22,17
	Azotobactéries	2,0	3,0	1,6	4,5	5,0	4,5	0,13	1,8	3,1		
	Engrais			NC	NC	2 NC	2 NC					
5	Microrganismes	1.400	2.180	600	2.340	2.400	4.500	6.000	2.500	2.780	81,5	23,00
	Azotobactéries	0,9	14,	0,3	2,8	3,5	3,0	6,0	2,5	2,55		
	Engrais			NC	2 NC	3 NC	2 NC					
6	Microrganismes	2.750	1.200	1.000	2.100	1.500	3.000	3.500	2.500	2.200	79,0	22,10
	Azotobactéries	1,2	25,	3,5	4,5	2,0	5,0	1,0	3,0	2,6		
	Engrais			2 NC	2 NC	2 NC	2 NC	2 NC				

NB. – Le nombre des microrganismes développés sur gélatine de viande et des azotobactéries est indiqué comme un millier dans un gramme de terre. Les engrais sont indiqués comme suit : NC (nitratatures avec nitrate de calcium); le numéro qui parfois précède NC signifie le nombre des traitements; Veg (Végétaline); NP (nitrate de potassium); CP (chlorure potassique); Ph (phosphate bi-ammoniaque); SA (sulphate d'ammoniaque).

Parcelle		Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avril	Mai	Juin	Moyenne des huit analyses	Récolte du blé (Kilogs) Total	Granella
	Températures moyenne ... maximum .. minimum ...	9,56 18,6 1,5	3,4 14,1 –6,8	5,12 16,0 –6,2	0,75 12,0 –8,0	5,65 16,7 –4,4	9,35 19,6 –0,6	14,8 27,2 4,7	17,38 29,1 0,8			
7	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	2.180 2,5	3.000 1,4	1.000 2,2	2.280 6,0	3.300 3,0	2.000 4,5	5.000 1,7	1.200 3,5	2.500 3,1	52,0	17,44
8	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	2.100 2,5	2.460 3,0	7.500 2,2 Veg.	2.400 10,0 Veg.	2.400 3,5 Veg.	2.500 4,3 Veg.	1.500 2,0	1.500 1,5	3.175 3,5	56,50	19,30
9	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	1.700 0,3	15.00 3,0	1.250 1,3 NP	1.900 1,0 NP	1.800 6,0 NP	3.500 7,7 NP	4.500 2,5	3.200 1,5	2.400 2,98	45,0	13,90
10	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	1.600 2,2	3.600 2,5	800 1,6 CP	3.600 6,0 CP	2.100 5,0 CP	3.000 6,0 CP	6.000 3,0	1.800 1,5	2.820 3,5	49,10	15,68
11	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	3.000 2,7	3.000 2,5	850 2,0 PhB	3.000 2,0 PhB	1.800 4,5 PhB	3.000 3,9 PhB	4.000 2,5	2.500 0,9	2.635 2,8	48,0	14,80
12	Microrganismes . . . . . . Azotobactéries . . . . . . Engrais	4.000 1,1	1.500 2,8	1.600 2,5 SA	2.400 7,9 SA	3.000 4,5 SA	6.000 5,7 SA	5.500 3,5	4.000 3,0	3.120 3,78	45,0	13,76

NB. – Le nombre des microrganismes développés sur gélatine de viande et des azotobactéries est indiqué comme un millier dans un gramme de terre. Les engrais sont indiqués comme suit : NC (nitratatures avec nitrate de calcium); le numéro qui parfois précède NC signifie le nombre des traitements; Veg (Végétaline); NP (nitrate de potassium); CP (chlorure potassique); Ph (phosphate bi-ammoniaque); SA (sulphate d'ammoniaque).

Par contre, il m'a été impossible de donner une expression numérique exacte des germes qui attaquent la cellulose. Soit en ensemençant les plaques avec les granules de terre, soit en y apportant de petits quantités de dilutions terreuses, on ne réussit presque jamais à se faire une idée exacte du contenu de ces germes, qui se développent dans les fibres de la cellulose et se répandent rapidement sans former de vraies colonies. Winogradsky conseille de recourir à l'essai chimique de la cellulose résiduelle après une période déterminée d'incubation; mais même là j'ai rencontré de très grandes difficultés et les résultats de quelques essais ont été très incertains.

Comme conclusion, j'ai dû me borner à suivre les données qualitatives de cette recherche et je puis affirmer que toutes, ou presque toutes les espèces récemment classées par Winogradsky ont été mises en évidence.

De manière toute particulière ont prédominé le vibrion « *Celvibrio* » de couleur crème et ocre et les formes sinueuses « *Cytophaga* ». Tout spécialement fréquente était l'espèce « *Cyt. Hutchinsonii* »; mais souvent aussi on mit en évidence la « *Cyt. Fubra* » et la « *Cyt Aurantiaca* ». Les espèces se rapportant au genre « *Celfalciculla* » ont été rares.

Avec une certaine fréquence, on a vu apparaître des formes bacillaires de couleur verte, qui pouvaient souvent se rapporter à celles décrites par Winogradsky et une autre forme que je crois nouvelle et que je suis encore en train d'étudier. Presque toujours j'ai obtenu un développement de moisissures de couleur noire. En comparant subjectivement les analyses des différents mois, je crois pouvoir affirmer ici avec certitude que, à partir du mois de mars, l'activité des germes de la cellulose a plus que doublé en comparaison des mois précédents.

***

Des oscillations évidentes sont inévitables à cause de l'extrême complexité et variabilité des rapports existants entre les différents facteurs qui sont en jeu dans le milieu naturel; toutefois, l'examen soit des chiffres relatifs aux différentes analyses, soit des moyennes nous permet de tirer plusieurs déductions intéressantes.

On observe, avant tout, que le lot N.º 1 qui n'a reçu aucun engrais azoté en couche superficielle présente le chiffre minimum de microbes aptes à se développer sur gélatine (microbes décomposants) et le plus grand nombre d'azotobactéries. Pour les microbes décomposants, on observe encore plus nettement, dans tous les lots (sauf le N.º 8) que leur nombre augmente progressivement, à partir du mois de novembre jusqu'au mois d'avril, mai, c'est-à-dire lorsque la température commence à s'élever; au mois de juin, par contre, on note une tendance à la diminution des microbes en question.

Les azotobactéries, dans la plupart des lots, nous montrent des nombres presque semblables, tandis que dans quelques uns l'influence chimique des engrais est évidente. De même, il est intéressant de voir dans le lot N.º 2 la brusque diminution des azotobactéries, consécutivement aux deux fortes administrations de nitrate. Au contraire, l'adjonction des engrais azotés à doses modérées, ne présente aucune action dépressive sur les azotobactéries; et dans le lot N.º 12, avec traitements répétés de sulfate d'ammoniaque, les analyses particulières, aussi bien que la moyenne, indiquent un même contenu élevé d'azotobactéries.

Ces observations concordent, en grande partie, avec les faits observés par les AA. précédents et, si des recherches de Conn, Harder, Vanderleck et Vass nous disent que pendant les mois les plus froids le terrain présente la plus grande quantité de germes, un nombre bien plus considérable d'analyses nous montre que le contenu microbien des terrains croît dès que la température s'élève, atteignant son *maximun* au printemps.

Quant aux azoto-bactéries, on sait qu'une élévation de la température amène l'augmentation de leur nombre, et que l'effet d'inhibition des nitrates sur leur développement (Winogradsky) ne peut être considéré comme exact que dans un sens relatif, puisqu'il n'y a pas de diminution des azoto-bactéries, si la quantité des engrais azotés est petite (Coleman).

Or, sur la base de mes recherches, on ne peut établir aucune conclusion sur un rapport entre le contenu microbien des différents lots et leur fertilité (récolte du blé). En laissant de coté la considération que ces rapports, même dans les recherches des autres auteurs, semblent très douteux (Waksmann, Stoklasa, Ehrenberg, Brown et Christensen admettent ce rapport, qui par contre est absolument nié par Meessen, Behn, Burgess et Neller) on doit observer surtout que dans le cas présent, le facteur: différences des engrais chimiques, devait nécessairement être prédominant sur tous les autres facteurs.

CONCLUSIONS.

D'après ce qui a été exposé, on peut tirer les conclusions suivantes:

1) Le nombre des germes cultivables en gélatine, contenus dans les terrains agricoles rationnellement cultivés et traités par des engrais, varie de 600.000 à 8.500.000 par gramme, d'après mes numérations personnelles.

2) Le nombre des azotobactéries varie de 300 à 10.000 par gramme de terre.

3) On a toujours constaté une grande quantité de germes dégradant la cellulose. On voit se répéter le fait, déjà observé par Winogradsky, de la grande multiplicité des espèces.

4) Au commencement du printemps, on a constaté une augmentation considérable soit du nombre des microbes cultivables en gélatine de viande, que des azoto-bactéries et aussi des germes dégradant la cellulose.

5) Les engrais abondants avec sels nitriques ont un effet dépressif sur le développement des azoto-bactéries; au contraire l'adjonction, même plusieurs fois répétée, de quantités relativement faibles de nitrates et de sels d'ammoniaque paraissent avoir une action favorable sur les azoto-bactéries.

6) Je n'ai pas pu mettre en évidence une influence quelconque d'autres engrais minéraux sur le contenu microbien des terrains examinés.

RESUMÉ.

L'A. en analysant 12 lots d'un même terrain cultivé avec du blé et traité par différents engrais, est arrivé aux conclusions suivantes.

Le nombre total des germes varie entre 600.000 et 8.500.000; celui des azotobactéries de 300 à 10.000. Dans tous les lots il a toujours relevé en grande nombre les espèces aérobies attaquant la cellulose. Le total des germes, tant des azoto-bactéries que des dégradateurs de la cellulose, augmente lorsque la température augmente et arrive à son *maximum* au printemps. Les engrais abondants en sels nitriques ont un effet dépressif sur les azoto-bactéries, tandis qu'à doses modérées ils paraissent avoir une action favorable.

ARNAUDI C. – **Sur les microbes fixateurs de l'azote dans les terrains de rizière.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Dans cette communication nous nous occuperons de quelques recherches d'orientation sur la microflore des rizières de Verceil. Ces recherches vont préluder à une étude plus étendue de ces terrains caractéristiques, étude qu'on commencera d'ici quelques mois, avec la collaboration de M. le Dr. Borasio, appartenant à la Station Expérimentale pour la culture du riz, à Verceil.

Etant donnée l'origine géologique variée et la nature physico-mécanique différente des terrains des rizières de Verceil (1) nous avons estimé bon d'examiner, au cours de nos épreuves expérimetales, des échantillons de terre provenant des trois zones les plus typiques. Et précisément:

1) *La zone de la Baraggia* qui comprend des terrains très compacts, constitués par des argiles blanchâtres avec un sous-sol également très compact. Ces terrains qui appartiennent à la période du déluge glaciaire quaternaire, et qu'on appelle d'habitude « ferretti » sont pour la plupart en friche ou en cours d'assainissement; tandis que de l'autre partie, surtout du côté du sud — d'où l'on a prélevé l'échantillon de la zone — on a déjà cultivé le riz.

2) *La zone des alluvions anciens terrassés,* à l'ouest de Verceil, comprenant des terrains de densité moyenne.

3) *La zone des alluvions récents* du torrent Cervo, comprenant des terrains éminemment sablonneux.

Pour chaque zone on a prélevé avec les précautions habituelles pour ce genre de recherches, deux échantillons appartenant à des pièces de terre en conditions de culture différentes, savoir:

Zone de la Baraggia:	I)	terrain de rizière de la première année;
	II)	» » » de la quatrième année;
Zone d'alluvions anciens:	III)	terrain de rizière nouvelle, sur pré;
	IV)	» » » ancienne;
Zone d'alluvions récents:	V)	terrain de rizière de la première année;
	VI)	» » » ancienne.

Les échantillons étaient prélevés de terrains non submergés et exactement pendant les dix premiers jours de juin 1932.

À l'automne prochain, on pourra donc établir des comparaisons entre les résultats obtenus précédemment et ceux qu'on obtiendra en examinant les mêmes terrains, après leur submersion.

Pour chaque échantillon de terrain on a fait les recherches suivantes:

I. – recherche concernant les cellulosolytiques aérobies du groupe *Cytophaga*;

II. – recherche concernant l'activité microbienne vis-à-vis des facteurs limitants le développement des azotobactéries, à l'aide des « *moulages* » de Winogradsky (2);

III. – recherche et dénombrement des azotobactéries au moyen de plaques de silico-gél et de gélose pure de De Rossi (3). En effet nous avons voulu répéter le dénombrement des azotobactéries, d'après les conceptions des expériences récentes faites par De Rossi. Nous avons pu constater que les différences numériques remarquées, demeurent dans les limites normales des erreurs de technique; par contre, l'avantage présenté par la préparation du terrain est vraiment notable.

Tous les examens de culture ont été pratiqués deux fois au moins, et les résultats sont rapportés dans le tableau suivant.

Echantillons	Présence de cellulosolytique	Azotobactéries	Réactions microbiennes des terrains
N. 1	Vis-à-vis de ces germes il est apparemment stérile, même après 8 jours.	Absents	Echantillon additionné de: 1. - Amidon: 0 0 0 2. - Amidon + $CaCO^3$: 0 0 0 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: 0 0 0
N. 2	3/4 des granules de terre ensemencés montrent un développement vigoureux de colonies jaune-ocracées et jaune-citrin; nombreuses moisissures vertes; rouges et noires. Prédominance des formes: *Cellvibrio*.	300 par la méthode de Win. par gramme de terre sèche 280 par la méthode de De Rossi	1. - Amidon: 0 0 0 2. - Amidon + $CaCO^3$: on voit sortir de la surface une dizaine de bulles ayant une odeur butyrique. *Préparation: clostridies.* Surface avec quelques taches rouges, luisantes. *Préparation: Azotobacter.* 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: les mêmes observations par le $CaCO^3$, mais en quantités plus faibles.
N. 3	Presque tous les granules de terre sont fertiles. Les colonies, bien relevées, tournent de l'ocre à l'orange et au citrin. Moisissures: absentes. Prédominance des formes: *Cestophaga, Cellvibrio.*	380 par la méthode de Win. par gramme 300 par la méthode de De Rossi	1. - Amidon: forte réaction: 3 grosses bulles; odeur fortement butyrique. *Préparation clostridies.* 3/4 de la surface est couverte par un enduit d'Azotobactéries. 2. - Amidon + $CaCO^3$: 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: } les mêmes observations que par l'amidon.
N. 4	3/4 des granules de terre sont fertiles. Prédominance de colonies ocracées et citrines. Présence de plusieurs moisissures. Prédominance des formes de *Cellvibrio.*	500 par la méthode de Win. par gramme 400 par la méthode de De Rossi	1. - Amidon: bonne réaction; bulles à l'odeur butyrique et surface avec plusieurs colonies d'Azotobactéries. 2. - Amidon + $CaCO^3$: les mêmes observations que par l'amidon. 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: bulles plus rares, surtout pour le phosphate.
N. 5	Seulement deux granules d'une des deux plaques sont fertiles. Couleurs: jaune-citrin et vert. Prédominance de la forme: *Cellfalcicula.*	Absents.	1. - Amidon: réaction discrète; bulles; la surface est rouge foncée, mais on ne peut pas identifier des colonies d'Azotobactéries. 2. - Amidon + $CaCO^3$: 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: } surface très luisante et rasée. Azotobactéries absents. Grosses bulles surtout par le phosphate.
N. 6	Dans les deux plaques préparées, les 4/5 des granules sont fertiles. Prédominance de colonies citrines et de moisissures. Prédominance des formes: *Cellvibrio, Cellfalcicula.*	Absents.	1. - Amidon: 0 0 0 2. - Amidon + $CaCO^3$: pigmentation marron presque noire de la surface; pas de bulles. 3. - Amidon + phosphate lypotoxique: bonne réaction; bulles; surface luisante, Azotobactéries absentes.

Des observations faites il ressort donc que même au point de vue microbiologique, les terrains des trois zones considérées, sont différents entre-eux.

I. – Les terrains de la zone de la Baraggia sont particulièrement pauvres en germes. Le terrain N.° 2 pourtant, tout en étant pauvre, possède une flore cellulosolytique et montre la présence d'azotobactéries, tandis que le terrain N.° 1 se comporte comme s'il était stérile. En effet, même par l'adjonction d'amidon et par le correctif de CaCO et du phosphate, il ne donne aucune réaction qui puisse décéler un développement de germe. Le terrain N.° 2 se montre, au contraire, sensible à l'adjonction de CaCO et, dans une proportion moins prononcée, même à l'adjonction de phosphate. Dans l'épaisseur du bloc de terre, des colonies de clostridies se développent avec leur odeur butyrique typique.

La microflore des terrains de la Baraggia de Verceil, rappelle pourtant celle de la Bruyère de la Lombardie (4) bien que la nature des deux zones, également pauvres, soit très différente.

II. – Les terrains de la seconde zone qui, au point de vue de la culture, sont les meilleurs, sont les plus riches en flore bactérienne cellulosolytique aérobienne et en azotofixateurs aérobies, aussi bien qu'anaérobies. En effet, dans tous les échantillons de ces terrains, variablement traités, on rencontre nombreux foyers de *Clostridium.*

III. – Les terrains de la zone des alluvions récents sont pauvres, soit en cellulosolytiques aérobies du groupe *Cytophaga,* soit en azotobactéries. Au contraire, les foyers de clostridies sont nombreux, quoique leur nombre soit plus petit que celui observé dans les terrains de la zone précédente.

Il me semble que, d'après ces quelques données recueillies jusqu'ici, la caractéristique générale de ces terrains peut être résumée comme il suit:

I. – Pauvreté en cellulosolytiques aérobies du groupe *Cytophaga* (qui, par contre, sont extrèmement nombreux dans les terrains cultivés ordinaires).

II. – Pauvreté en azotobactéries existant même dans les meilleurs terrains de rizière. En effet, pour une moyenne de 2500 azotobactéries par gramme, trouvée par De Rossi dans les terrains du Nord de l'Italie, nous en avons seulement 500 par gramme.

III. – Richesse considérable en *Clostridium.*

Il faut ne pas oublier que ces observations ont été faites sur des terrains qui étaient à sec depuis huit mois et, par suite, dans des conditions qui ne sont pas les plus caractéristiques des cultures.

Cela fait espérer que les examens des échantillons provenant des mêmes pièces de terre, puissent fournir, après la période de submersion, des données instructives pour la caractérisation microbiologique de cette culture italienne typique et pour une orientation logique de l'étude qu'on a l'intention de poursuivre.

BIBLIOGRAPHIE.

(¹) *L. Borasio*, « Il Vercellese. Studio, ricerche, ecc. ». Quaderni della Stazione Sperimentale di Risicoltura di Vercelli, 1929, anno III, n. 4.
(²) *S. Winogradsky*, « Sur le pouvoir fixateur des terres ». Annales de l'Institut Pasteur, 1928, T. XLII, pag. 36.
(³) *De Rossi*, « La fixation de l'Azote élémentaire dans le sol. Isolement et dénombrement des *Azotobacters* ». Bollettino Soc. Inter. di Microbiologia, sez. Ital., 1932, fasc. 7-8.
(⁴) *C. Arnaudi*, « La flora microbica della Brughiera Lombarda nei suoi rapporti con la Bonifica ». Nuovo Giornale Botanico Italiano, N. 8, vol. 37, 1930.

BONANNO A. M. – **Immunité locale et muqueuse intestinale.**

(Communication présentée au IVᵉ Congrès Italien de Microbiologie, de Milan.

J'ai voulu étudier l'importance de la perméabilité intestinale par rapport à un état immunitaire qui, d'après Besredka, doit être considéré comme d'origine locale, pour quelques antigènes bactériens correspondants aux infections à localisation intestinale prépondérante. C'est pourquoi, j'ai entrepris ces recherches, en administrant, en déhors des antigènes bactériens, des antigènes protéiques et en agissant sur les conditions anatomiques de l'intestin au moyen des Rayons Roentgen.

L'on connait les idées de Besredka sur ce chapitre de l'immuno-biologie. Diverses recherches ont été faites pour soumettre à la critique ces opinions, et toutes les conclusions n'ont pas été toujours favorables.

Les points fondamentaux sur lesquels est basée la doctrine de Besredka sont principalement deux:

1) Possibilité de contact du vaccin ou du liquide de culture administré, avec les cellules intestinales; cette condition peut être obtenue en éloignant la couche de mucus intestinal par une sécrétion biliaire abondante, provoquée par un colagogue très fort, tel, par exemple, que la bile elle-même.

2) Apparition d'un état immunitaire local, spécial aux cellules réceptives de l'intestin, indépendemment de l'apparition d'anticorps dans le sang circulant.

En cette matière, il faut encore rappeler ici que la substance anti-

génique, d'origine bactérienne ou d'autre provenance, en tant que substance protéique ou lipo-protéique subit une digestion dans le tube gastro-intestinal. Il se peut qu'après cette modification, elle puisse déterminer dans l'organisme traité des caractéristiques particulières d'ordre immunitaire.

On sait déjà, d'après de nombreuses recherches, que lorsque-les substances protéiques introduites dans le tube digestif, sont exposées à l'action des sucs digestifs et de la flore microbienne intestinale, elles perdent leur pouvoir antigénique, en subissant une véritable dépolymérisation et une dénaturation. De la primitive molécule protéique, grosse et compliquée, prennent naissance des produits simples, solubles, diffusibles, non plus colloïdes mais cristalloïdes, et dépourvus de tout pouvoir antigénique (Rondoni). Cependant il est admis que des fractions, de différentes parties de la substance protéique ingérée, non scindées et non altérées puissent pénétrer à travers la barrière intestinale dans le sang. En effet, Belfanti, Ascoli et Viganò, par la recherche des précipitines, et Micheli par la recherche du pouvoir sensibilisant, ont démontré le passage, dans le sang, à travers le tube digestif, d'albumines qui avait échappé à la dissociation hydrolytique.

Des conditions particulières de la paroi intestinale peuvent encore favoriser ce passage; en effet, on a vu que la permeabilité intestinale aux albumines est plus considérable chez les animaux nouveau-nés sains, ou bien à la suite d'administration de soude, d'huile de croton, de doses élevées de sucre, ou après un jeûne prolongé, ou enfin après la diminution des pouvoirs enzymatiques du suc gastro-entérique, due, par exemple, à des conditions morbides. L'administration de bile semble exercer, elle-aussi, une action analogue, quoique moins intense, sur la paroi intestinale pour ce qui concerne le passage des fractions protéiques.

Besredka, qui dans ses premiers travaux limite l'action de la bile — même au cours d'une abondante sécrétion biliaire provoquée — à l'éloignement de la couche du mucus intestinal, parle dans des publications ultérieures, d'une véritable perméabilité intestinale vis-à-vis de l'antigène bactérien.

Makaroff a pu provoquer un état d'anaphylaxie vis-à-vis du lait, en administrant simultanément de la bile de boeuf; de même, Arloing a pu faire des expériences démonstratives sur l'anaphylaxie alimentaire, en administrant de la bile en même temps.

Par mes recherches actuelles je me suis proposé d'étudier la façon de se comporter de l'intestin chez l'animal irradié par les Rayons Roentgen, lorsqu'il reçoit par la voie buccale (*per os*) une protéine hétérogène ou une substance vaccinante supposée capable d'une affinité particulière envers les cellules de la muqueuse intestinale. L'étude de la perméabilité de l'intestin irradié, vis-à-vis de la protéine administrée *per os* (sérum de

sang humain) a été poursuivie par la recherche des précipitines et de l'état de sensibilisation anaphylactique vis-à-vis de la même protéine humaine.

Pour étudier la vaccination par la voie buccale chez l'animal irradié, on a utilisé le vaccin typhique; on a contrôlé l'état de vaccination, même par l'étude des agglutinines dans le sang circulant et par l'évaluation de la résistance de l'animal vis-à-vis d'une dose bactérienne mortelle pour les témoins non traités, injectée par la voie intra-péritonéale.

La dose d'irradiation administrée une ou plusieurs fois, correspondait à ⅓ HED en surface, pour chaque fois.

Pour ce qui se rapporte à l'épreuve de la précipitation on a constaté l'absence de précipitine dans les cobayes témoins, même après l'administration répétée de la substance protéique correspondante; tandis que chez les cobayes irradiés 12-14 heures avant l'administration on observe l'apparition de précipitines à des titres différents, suivant le nombre des administrations de sérum humain.

Pour la sensibilisation anaphylactique aussi, on a observé que l'irradiation, qui est associée ou qui précède l'injection préparante, favorise le déclanchement d'un état anaphylactique, parfois même avec des conséquences mortelles, ce qui n'est pas arrivé dans le groupe des témoins non irradiées.

En ce qui concerne l'épreuve de la vaccination, on a constaté que l'administration d'une dose déterminée de vaccin typhique, répétée 3 ou 4 fois et précédée par l'irradiation, a empêché plusieurs fois les animaux de succomber à la suite de l'injection d'une dose bactérienne mortelle, ce qui ne se vérifie pas chez les témoins non irradiés. On a constaté aussi chez quelques cobayes l'apparition d'un titre d'agglutination faible (1 : 50); mais on n'a remarqué aucun rapport entre la survivance des animaux à la dose bactérienne mortelle et le taux d'agglutination; celui-ci tantôt manquait, tantôt existait chez l'animal ayant survécu ou mort.

Des coupes histologiques pratiquées sur la paroi intestinale des animaux irradiés, ont montré des lésions plus ou moins prononcées, suivant la dose d'irradiation administrée; ces lésions étaient localisées dans la muqueuse, dans la partie basale de la muqueuse et dans la sous-muqueuse.

De ces recherches, on peut tirer les conclusions suivantes: les irradiations Roentgen, de même que certaines substances (soude, huile de croton, doses élevées de sucre, bile, etc.) peuvent augmenter la perméabilité intestinale et permettre le passage de fractions de la substance protéique administrée; le fait est mis en évidence par l'apparition, dans le sang, de précipitines et d'anticorps anaphylactisants.

La raison pour laquelle l'administration du vaccin typhique, en même temps que l'irradiation de l'abdomen de l'animal, préserve l'animal

même de l'infection bactérienne, mortelle pour les animaux de contrôle, doit probablement être rapportée à la réaction immunitaire provoquée chez l'animal, par l'entrée à travers la paroi intestinale altérée, de fractions de protéine bactérienne. L'action de la bile devrait être considérée comme analogue, quoique dans un degré différent, à celle des irradiations; cela a été démontré par la possibilité d'établir un état anaphylactique à la suite de l'administration de cette substance.

En plus, la protéine bactérienne se comporterait de la même façon que la protéine humaine admistrée *per os*, car son action s'exercerait du fait de son passage dans le sang circulant, plutôt que par sa fixation sur les cellules réceptives de la muqueuse intestinale, altérées d'une façon plus ou moins intense — au cours de nos recherches — par l'action des irradiations.

DE SANCTIS MONALDI T. – **L'action de certains sels organiques de calcium sur le "phénomène de Koch".**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Les recherches faites récemment par Boquet sur le « phénomène de Koch » tenderaient à démontrer que la réaction nécrosique du derme, provoquée chez les cobayes tuberculeux par l'injection locale de bacilles tuberculeux, serait liée uniquement à une hypersensibilité déterminée par l'infection et mise en évidence par la tuberculine libre des corps bacillaires, ou libérée par ceux-ci dans le derme.

Chez les cobayes tuberculeux, cette allergie est associée à une immunité notamment locale, plus ou moins efficace, caractérisée par la stabilisation, la régression et la cicatrisation de l'ulcère formé après l'inoculation, par voie sous-cutanée ou intra-dermique, de bacilles virulents.

D'ailleurs, si quelques auteurs n'ont pas observé de modifications du « phénomène de Koch » après le bloccage du système réticulo-endothélial (Thomoff), d'autres (Medovikov) auraient constaté des variations de la réaction tuberculinique après l'injection de substances agissant sur le sympatique ou sur le vagus (pilocarpine, atropine, vagotonine, sympathol, etc.).

En étudiant la sensibilité cutanée locale vi-à-vis du sérum de cheval, Klinge aurait démontré qu'il existe une histo-anaphylaxie, indépendante du sérum de sang, car l'injection de trypan-bleu, pratiquée par voie intra-dermique ou sous-cutanée, préserverait les animaux contre l'inflammation anaphylactique dans le territoire « bloqué » de la sorte.

Au lieu d'avoir recours à des substances colorantes qui, comme le trypan-bleu ou l'encre de Chine, mettent probablement en jeu une seule espèce de cellules du réticulo-endothélium et peut-être celles qui ne jouent pas le rôle plus important dans la production des réactions inflammatoires du « phénomène de Koch », nous avons utilisé le calcium. Il s'agit d'un électrolyte très répandu dans l'organisme et qui participe au rôle énergétique des substances ayant une action sur le sympathique ou sur le vague. Le calcium, pourtant, ainsi que Sabbatini l'a démontré le premier, agit seulement quand il se trouve sous forme ionisée; l'investigation physico-clinique, en confirmant cette donnée, a mis en évidence les autres propriétés de cet élément, propriétés qui nous intéressent particulièrement pour l'étude des phénomènes d'immunité locale anti-tuberculeuse caractérisant le « phénomène de Koch ».

En effet, le calcium réaliserait une forte constriction des capillaires (Busquet et Pachon); il diminuerait la perméabilité des vaisseaux, en développant ainsi une action anti-anaphylactique et surtout anti-phlogistique. Or, comme le processus inflammatoire est à la base du « phénomène de Koch », nous avons voulu voir de quelle façon il se modifie, et c'est pourquoi nous avons préparé un territoire cutané chez un cobaye tuberculeux, par injection intradermique de gluconate ou de pyruvate de chaux: ceux-ci sont des sels organiques de calcium, bien diffusibles, suffisamment ionisables et dépourvus de toute action caustique.

1er Groupe d'expériences. — Douze cobayes infectés par voie sous-cutanée, avec 1/100 de mgr. de bacilles tuberculeux de boeuf (souche Vallée) présentent au bout de trois semaines, une réaction nécrotique consécutive à l'injection intra-dermique de cmc. 0,1 de tuberculine brute, délayée à 1/10. Dix jours après, au moyen d'une série d'injections intradermiques, on infiltre une zone circulaire de peau saine, du diamètre de 2-3 cm., avec une solution stérile de gluconate de calcium à 10%. La quantité de calcium élémentaire injectée localement correspond à 18 mgr. Au bout de 24 heures, la zone cutanée infiltrée présente un aspect et un teint normaux; c'est seulement à la palpation qu'on peut apprécier un épaississement très léger par comparaison avec un point épilé de la peau normale.

On pratique alors, au centre de cette zone cutanée, l'injection intradermique de 2 mgr. de bacilles tuberculeux vivants, de la même souche, émulsionnés dans cmc. 0,2 de solution physiologique. Une dose égale est inoculée ensuite dans la peau saine du côté opposé, sur le même animal; on fait la même épreuve sur douze cobayes tuberculeux (témoins) qui n'ont reçu aucun sel de calcium.

Au bout de 48 heures, on voit apparaître, soit dans la zone cutanée

ayant reçu le gluconate de calcium, soit dans les zones de contrôle, un « phénomène de Koch » net et typique, qui, dans les jours suivants, évolue selon la description classique, sans qu'on puisse remarquer aucune différence.

Un lot identique de cobayes tuberculeux (inoculés avec 1/100 de mgr. de B. Vallée, par la voie sous-cutanée), qui présentent une nette réaction allergique à la tuberculine, reçoit par la voie intradermique une dose de solution de piruvate de calcium à 7%, correspondant à 18 mgr. de calcium élémentaire.

L'injection intradermique de 2 mgr. de bacilles de boeuf émulsionnés dans cmc. 0,2 de solution physiologique, pratiquée après 24 heures, détermine même chez ces animaux le « phenomène de Koch » le plus typique. C'est seulement chez deux cobayes, sur douze, qu'on obtient la guérison de la lésion locale plus rapidement au point préparé par le sel de calcium, comme si le processus inflammatoire avait été ici moins important.

Cette petite modification dans le processus évolutif du phénomène nous a amené à penser que, probablement, la dose de calcium restée fixée dans le derme 24 heures après l'injection était trop faible pour pouvoir manifester encore une action évidente, vis-à-vis de la masse microbienne et tuberculinique, vraiment considérable, de 2 mgr. de bacilles tuberculeux vivants. Tout en gardant la même quantité de gluconate et de pyruvate de calcium employée, nous avons alors cherché la « dose limite » de bacilles (B. Vallée), apte à déterminer un processus local qui fût encore comparable au « phénomène de Koch », sans que l'intensité de ce processus atteignit le degré observé avec la dose de 2 mgr.

Lorsqu'on descend au dessous de la dose d'un mgr. tous les animaux ne répondent pas de façon évidente, mais encore à la dose de 2/10 de mgr. le pourcentage des résultats nettement positifs oscille, sans subir de gros déchêt, autour de 80%.

Pour le deuxième groupe d'expériences nous avons utilisé cette dernière dose, car avec des quantités inférieures de bacilles vivants, les réactions atypiques dépassent le 50%.

2ème GROUPE D'EXPÉRIENCES. — Douze cobayes infectés par voie sois-cutanée, avec 1/100 de mgr. de B. Vallée, réagissent nettement, au bout de trois semaines, à la réaction intradermo-tuberculinique. Après dix jours, on pratique dans une zone épilée de peau normale, l'jnjection intradermique de gluconate de calcium (18 mgr. de Ca élémentaire). Après 24 heures, la peau préparée de la sorte a un aspect et une consistance absolument normaux: on injecte alors dans son épaisseur 2/10 de mgr. de bacilles de boeuf (B. Vallée) provenant d'une culture développée sur pomme de terre depuis 15 jours. On injecte une dose identique dans un

point épilé de la peau, du côté opposé du même animal et dans le derme de six cobayes tuberculeux n'ayant jamais reçu des sels de calcium.

Au bout de 24 heures, on n'observe dans la zone cutanée préparée de 8 cobayes sur 12 qu'une légère rougeur ayant la dimension d'un centime; la peau est légèrement infiltrée. Du côté opposé, la zone enflammée a l'étendue d'une monnaie de deux centimes au moins, et dans son centre on observe déjà un tout petit abcès, gros comme la tête d'une épingle. Après 48 h. il y a encore une différence entre les deux zones, quoique moins prononcée qu'auparavant. Le volume du petit abcès, dans la zone non préparée avec le calcium, augmente rapidement; par contre, celui qui apparaît dans la zone préparée est plus petit. À la 72ème heure il n'est plus possible de remarquer aucune différence nette entre les réactions du même animal et la réaction des cobayes témoins: l'évolution ultérieure du phénomène se développe ensuite chez tous les animaux, avec son rythme classique.

L'apparition des réactions d'ordre vasomoteur, qui annoncent le « phénomène de Koch » s'est manifestée chez les deux tiers des cobayes seulement avec un léger retard, tandis que dans l'autre tiers on n'a pu remarquer aucune modification.

On a répété la même expérience sur un nombre égal de cobayes tuberculeux préparés par injection intradermique d'une solution de pyruvate de calcium (18 mgr. de Ca élémentaire). Neuf cobayes sur douze, ainsi préparés, ont présenté non seulement après 24 heures, mais encore après 48 heures des phénomènes réactionnels (rougeur, infiltration, formation d'abcés) nettement plus limités que ceux que l'on observe au cours des réactions témoins. A partir de ce moment les processus tendent à s'égaliser, soit pour l'étendue, soit pour l'intensité de leur évolution, suivant partout la réaction-type classique.

Les sels de calcium que nous avons utilisés sont les plus diffusibles parmi ceux qui sont formés par cet élément; néanmoins, on doit admettre que leur dispersion dans le derme se réalise assez lentement, puisque, encore après 48 heures, ils exercent une action évidente sur le réseau sanguin papillaire et sous-papillaire du chorion. Les modifications de l'intensité de la vaso-dilatation et de la diapédèse, provoquées par l'injection d'une nouvelle dose de bacilles vivants dans la peau des animaux tuberculeux préparés localement avec les sels susdît, doivent être en rapport avec l'action anti-phlogistique et anti-diapédétique exercée par le calcium, action qui sert, dans un premier temps, à neutraliser en partie l'effet de la tuberculine libre injectée avec les corps microbiens vivants.

Ces derniers continuent, pourtant, à mettre en liberté de nouvelles quantités de tuberculine qui peuvent agir alors sur le réseau capillaire

et déterminer, après le peu de retard signalé plus haut, un « phénomène de Koch » classique.

Après tout ce qu'on a exposé, on peut affirmer que:

1) Le gluconate et le pyruvate de calcium exercent sur la circulation cutanée locale des cobayes tuberculeux les mêmes effets physiologiques que l'on constate chez les cobayes normaux.

2) On peut observer cette action, en utilisant la « dose limite » de bacilles tuberculeux apte à produire encore un « phénomène de Koch » typique. En général, la peau des cobayes tuberculeux « bloquée » à l'aide des deux sels de calcium ci-dessus, réagit au début d'une façon moins intense que celle de la peau non préparée, du même animal ou d'un animal témoin.

3) Les phénomènes essentiellement vasculaires, déterminés par la tuberculine sont donc, au commencement, la base de tout le mécanisme immunitaire représenté par le « phénomène de Koch ».

RESUMÉ.

L'A. en utilisant la « dose limite » de bacilles tuberculeux apte à déterminer encore un « phénomène de Koch » typique, a constaté que la peau des cobayes tuberculeux « bloquée » par le gluconate ou le piruvate de calcium réagit au debut d'une façon moins intense que celle de la peau non préparée du même animal ou d'un animal témoin. Il affirme à nouveau que les phénomènes essentiellement vasculaires déterminés par la tuberculine sont à la base de l'immunité locale représentée par le « phénomène de Koch ».

ERRATA CORRIGE.

A page 282 ligne 11 et 37 au lieu de *pluribacillaire* lire *paucibacillaire*. A page 383 ligne 2 de la Note au lieu de *emulsion rapide* lire *emulsion soigneuse*. A page 384 ligne 6 au lieu de *minutes* lire *jours* et à la même page ligne 38 au lieu de *réaction* lire *fraction*.

Direttore responsabile: Dr. Prof. A. Zironi.